

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

APROTININ UND MODIFIZIERTE INHIBITOREN:
SYNTHESE, BIOCHEMISCHE UND
PHARMAKOKINETISCHE EIGENSCHAFTEN VON
DERIVATEN DES BREITSPEZIFISCHEN
PROTEINASEINHIBITORS AUS
RINDERORGANEN (TRASYLOL^R)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
in der Humanbiologie
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HARALD DIETER SCHULT
aus Cassenvitz/Rügen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555623_0006

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie
und Pathologische Biochemie
(Vorstand: Prof. Dr. W. Lorenz)
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg/Lahn
(Direktor: Prof. Dr. H. Hamelmann)

APROTININ UND MODIFIZIERTE INHIBITOREN:
SYNTHESE, BIOCHEMISCHE UND
PHARMAKOKINETISCHE EIGENSCHAFTEN VON
DERIVATEN DES BREITSPEZIFISCHEN
PROTEINASEINHIBITORS AUS
RINDERORGANEN (TRASYLOL^R)

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
in der Humanbiologie
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

HARALD DIETER SCHULT

aus Cassenvitz/Rügen

Marburg 1977

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 4.8.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. W. Lorenz
Correferent: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Darstellung des Arbeitsgebietes	1
1.1 Historischer Überblick über die Entstehung des Kallikrein-Kinin-Systems und seiner Inhibitoren	1
1.2 Biochemie des Kallikrein-Kinin-Systems	3
1.3 Biochemie des breitspezifischen Proteinase-Inhibitors aus Rinderorganen (Kallikrein-Trypsin-Inhibitor, KTI, Aprotinin, Trasylol)	12
1.4 Pharmakologie und Pathophysiologie des Kallikrein-Kinin-Systems und seiner Inhibitoren	23
1.4.1 Pharmakologie	23
1.4.2 Pathophysiologie	25
2. Ziele der Arbeit	30
3. Material und Methodik	31
3.1 Material	31
3.1.1 Enzyme	33
3.1.2 Natives Aprotinin und modifizierte Inhibitoren	33
3.1.2.1 Aprotinin	33
3.1.2.2 Polyaminosäurederivate des Aprotinins	34
3.1.2.3 Albumin-Aprotinin	35
3.1.2.4 Acylderivate des Aprotinins.	36
3.1.2.4.1 Acylderivate mit Schutz des Lysin-15 im reaktiven Zentrum	36
3.1.2.4.2 Pentamaleoylderivat des Aprotinins	39
3.1.2.5 Derivate des Aprotinins mit Aminogruppenreagenzien (Dansylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat	39

3.1.2.5.1	Trypsin-Aprotinin-Komplexbildung und Umsetzung mit Dansylchlorid	40
3.1.2.5.2	2,4-Dimethylphenylcyanat-Aprotinin	40
3.1.2.6	Tetrahomoarginin-Aprotinin	41
3.1.2.7	Selektiv reduziertes Aprotinin	41
3.1.2.8	Derivate von bereits modifiziertem Aprotinin	42
3.1.2.8.1	Substitution der freien Cystein-Reste im Aprotinin	42
3.1.2.8.1.1	Umsetzung der freien Sulfhydryde mit Jodacetamid	42
3.1.2.8.1.2	Umsetzung der freien Sulfhydrylgruppen mit Jodessigsäure	43
3.1.2.8.1.3	Umsetzung der freien Sulfhydryle mit Äthylenimin	43
3.1.2.8.2	Modifizierung des Tetramaleoyl-Aprotinin am Lysin 15	44
3.1.2.8.2.1	Darstellung von Tetramaleoyl-(15-homoarginin)-Inhibitor	44
3.1.2.8.2.2	Darstellung von Tetramaleoyl-(15 N-carbamoyl-lysin)-Aprotinin	44
3.1.3	Anorganische und organische Reagenzien. Anorganische Substanzen. Organische Substanzen.	45
3.2	Methoden	46
3.2.1	Enzymteste	46
3.2.1.1	Bestimmung der Trypsinhemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970)	46
3.2.1.2	Bestimmung der Chymotrypsin-Hemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970)	48
3.2.1.3	Bestimmung der Kallikrein-Hemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970)	49
3.2.1.4	Bestimmung der Plasmin-Hemmung nach FRITZ et al. (1970)	50
3.2.1.5	Bestimmung des Inhibitorgehaltes von Geweben, Serum und Harn	51

3.2.2	Aminogruppenbestimmung im Aprotinin und seinen Derivaten	51
3.2.2.1	Bestimmung der freien Aminogruppen in Aprotininderivaten mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure nach HAYNES et al. (1967)	52
3.2.2.2	Bestimmung der freien Aminogruppen in den Inhibitoren durch Dansylierung nach GRAY (1967)	52
3.2.2.3	Bestimmung der maleoylierten Aminogruppen durch UV-Absorptionsmessungen bei 250 nm nach BUTLER et al. (1969)	53
3.2.3	Elektrophorese mit den Inhibitoren	53
3.2.4	Aminosäureanalysen	54
4.	Ergebnisse	54
4.1	Eigenschaften des Aprotinins und der modifizierten Inhibitoren	54
4.1.1	Chemische Konstitution von Aprotinin und den modifizierten Inhibitoren	54
4.1.1.1	Natives Aprotinin und die Polyamino-säurederivate des Aprotinins	55
4.1.1.2	Albumin-Aprotinin	57
4.1.1.3	Acylderivate des Aprotinins	57
4.1.1.4	Derivate des Aprotinins mit Dansylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat	62
4.1.2	Modellvorstellungen über Aprotinin und die modifizierten Inhibitoren sowie Formulierung der Reaktionen	65
4.1.3	Hemmung der proteolytischen Enzyme durch natives Aprotinin und seine Derivate	67
4.1.3.1	Hemmung der proteolytischen Enzyme durch Aprotinin und die Polyamino-säurederivate	67
4.1.3.2	Hemmung von Trypsin und Kallikrein durch Aprotinin und Albumin-Aprotinin	69
4.1.3.3	Acylderivate des Aprotinins	69
4.1.3.3.1	Vergleich der Hemmaktivität der Inhibitoren gegenüber verschiedenen Proteasen	69

4.1.3.3.2	Vergleich der Komplexbildungsgeschwindigkeit zwischen proteolytischen Enzymen und Inhibitoren zur Erreichung der zeitlich optimalen Hemmung	74
4.1.3.4	Pentamaleoylderivat des Aprotinins	77
4.1.3.5	Derivate des Aprotinins mit Aminogruppenreagenzien	81
4.1.3.6	Selektiv reduziertes Aprotinin und Derivate von bereits modifiziertem Aprotinin	83
4.1.3.7	Tetramaleoyl-homoarginininhibitor	85
4.1.3.8	Tetramaleoyl-(15 N ^ε -carbamoyl-lysin)-Aprotinin	88
4.2	Ausbeutebestimmungen beim Umsatz von Aprotinin mit den verschiedenen Reagenzien	90
4.3	Pharmakokinetik verschiedener Inhibitorderivate	92
5.	Diskussion	98
6.	Zusammenfassung	105
	Literaturverzeichnis	108

1. DARSTELLUNG DES ARBEITS- GEBIETES

1.1 HISTORISCHER ÜBERBLICK ÜBER DIE ENTSTEHUNG DES KALLIKREIN-KININ-SYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN

Kallikrein wurde von E.K. FREY (1926) entdeckt, der bei experimentellen Studien über die "reflektorische Anurie" beobachtete, daß die intravenöse Injektion von Hundeurin bei derselben Spezies den arteriellen Blutdruck senkte. Diese lang andauernde Hypotension wurde durch eine hochmolekulare, thermolabile Substanz verursacht, die später den Namen Kallikrein erhielt, da sie auch im Pankreas (griechisch: Kallikreas) nachgewiesen werden konnte (KRAUT et al. 1930).

1936 fand E. WERLE (1936), daß Kallikrein im Serum eine Substanz freisetzte, die die glatte Muskulatur des isolierten Meerschweinchen- und Hundedünndarms stark kontrahierte. In Abwesenheit von Serum wirkte Kallikrein nur sehr schwach auf den Hundedarm, am Meerschweinchenileum überhaupt nicht. Dies ließ E. WERLE vermuten, daß Kallikrein kein Kreislaufhormon darstellte, wie E.K. FREY angenommen hatte, sondern ein Enzym wäre, das aus einer Vorstufe im Serum erst die aktive Substanz freisetzte. Diese aktive Substanz erhielt den Namen Kallidin; die Vorstufe, das Substrat des Kallikrein, wurde als Kallidinogen bezeichnet.

ROCHA E SILVA et al. (1949) entdeckte nach Inkubation von Serum mit Trypsin bzw. mit Schlangengiften und Injektion des Gemisches beim Hund ebenfalls eine blutdrucksenkende Substanz, die den Namen Bradykinin erhielt, weil sie den isolierten Meerschweinchendarm etwa 10 - 15 mal langsamer

kontrahierte als Histamin oder Acetylcholin. Der sich aus dieser Entdeckung entwickelnde Streit um die Erstbeschreibung des Kallikrein-Kinin-Systems wurde durch die Aufklärung der Aminosäurezusammensetzung und -sequenz von Kallidin und Bradykinin durch ELLIOTT et al. (1961) endgültig entschieden. Danach ist Bradykinin ein Nonapeptid und Kallidin ein Dekapeptid, das einen zusätzlichen Lysylrest am Aminoende des Bradykinin enthält: Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Arg. Die Entdeckung des Kallikrein-Kinin-Systems kommt damit eindeutig E. WERLE zu, eine zweite, davon unabhängig erfolgende, M. ROCHA E SILVA.

Im Jahre 1930 fand KRAUT et al. auf der Suche nach dem Entstehungsort des Kallikreins in verschiedenen Organen des Rindes (Parotis, Lymphknoten, Milz und Leber) einen Hemmstoff für Kallikrein. 1936 gelang es M.J. KUNITZ aus dem Pankreas derselben Tierart einen Trypsininhibitor zu isolieren. Schließlich konnte T. ASTRUP (1950) einen Plasminhemmstoff ("Pulmin") aus Rinderlunge gewinnen. E. WERLE et al. (1952) erkannten zu Beginn der fünfziger Jahre, daß die drei genannten, aus verschiedenen Organen des Rindes stammenden Inhibitoren sowohl Trypsin und Chymotrypsin als auch Kallikrein hemmten. R. MARX et al. (1959) bewiesen ferner, daß auch das Plasmin von dem in allen untersuchten Rinderorganen vorkommenden Kallikrein-Trypsin-Inhibitor gehemmt wird. Deshalb wurde dieser Hemmstoff zunächst als polyvalenter Proteasehemmstoff bezeichnet. Da aber der Inhibitor für die verschiedenen Enzyme nur ein einziges Hemmzentrum besitzt, kann die Bezeichnung "polyvalent" zu Mißverständnissen führen. Aus diesem Grunde hat M. LAS-KOWSKI, Jr. (1974) vorgeschlagen, ihm den Namen "breit-spezifischer Proteinase-Inhibitor" zu geben. Als medizinisch verwendetes Präparat heißt er Aprotinin (Trasylol^R) (1959).

1953 wurde der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor auf Vorschlag von FREY und WERLE erstmals bei der Behandlung der akuten Pankreatitis eingesetzt, in deren Pathogenese ihm bei der Freisetzung von aktivem Trypsin, Chymotrypsin und Kallikrein eine wichtige Rolle zugewiesen wurde. Weitere Indikationen für den breitspezifischen Proteinaseinhibitor fanden sich in der Therapie des Schocks sowie anderer schwerer Krankheitszustände mit gesteigerter Fibrinolyse, z.B. bei der Geburtshilfe.

Neben dem breitspezifischen Inhibitor aus Rinderorganen wurden weitere natürlich vorkommende Hemmstoffe des Kallikreins entdeckt. KRAUT et al. fanden z.B. bereits 1928, daß die hypotensive Wirkung von Kallikreinlösungen ausbleibt, wenn man sie mit Vollblut oder Serum verschiedener Spezies mischt. Nach heutigem Wissen handelt es sich dabei um Proteinaseinhibitoren des Serums, wie α_1 -Antitrypsin, α_2 -Makroglobulin, C_1 -Inaktivator und verschiedene andere Trypsininhibitoren (HEIMBURGER, 1974).

1.2 BIOCHEMIE DES KALLIKREIN-KININ-SYSTEMS

Wie bei einigen anderen körpereigenen Wirksystemen, z.B. dem Angiotensin-Renin-System, dem Gerinnungs-, Fibrinolyse- oder dem Komplementsystem, so sind auch beim Kallikrein-Kinin-System eine Reihe von proteolytischen Enzymen, Substraten und Produkten beteiligt. Dabei läuft eine Kaskade von biochemischen Reaktionen ab, die zunächst zu einer Aktivierung und dann zu einer Inaktivierung des Systems führt.

Durch verschiedene proteolytische Enzyme, z.B. Trypsin (WERLE und VOGEL, 1961) und Hageman-Faktor (WEBSTER et al., 1961, 1965, 1966) wird die Vorstufe des aktiven Kallikreins, das Kallikreinogen, in aktives Kallikrein überführt. Dieses spaltet aus einem Protein der α_2 -Globulinfraction des menschlichen Serums, das als langkettiges Kininogen bezeichnet wird, ein Polypeptid von zehn Aminosäuren ab, das Kallidin. Dieses Dekapeptid ist biologisch hoch aktiv. Durch Carboxypeptidase B wird Kallidin mit hoher Umsatzgeschwindigkeit wieder inaktiviert (WERLE, 1937, 1939). Aminopeptidasen spielen keine physiologische Rolle beim Abbau der Kinine (BOISSONNAS, 1960).

Kallikrein, bzw. die Kallikreine (EC 3.4.4.21) sind der dritten Hauptklasse der Enzyme, den Hydrolasen, zugeordnet. Sie finden sich in der vierten Untergruppe, den Proteinasen, zusammen mit Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin und verschiedenen anderen Endopeptidasen.

Isoenzyme des Kallikreins konnten aus folgenden Organen isoliert werden: Glandulae submandibulares (ROEDER, 1968), Schleimhaut von Jejunum, Coecum, Colon und Ileum (WERLE und VOGEL, 1961), Pankreas (HABERMANN, 1961, 1962), Niere (CARVALHO, 1964), Lunge (WERLE und MAIER, 1955), Gehirn und peripheres Nervensystem (WERLE und VOGEL, 1961) und Carcinome (OATES et al., 1964). Aus folgenden Körperflüssigkeiten ließen sie sich ebenfalls isolieren: Blutplasma (MORIYA et al., 1965), Harn (ROEDER, 1968), Lymphe (WERLE und VOGEL, 1961) und Schweiß (FOX und HILTON, 1958).

Die Kallikreine werden bei pathophysiologischen Prozessen im Organismus, wie Trauma, Hitze, Bestrahlung, Entzündung und Antigen-Antikörper-Reaktion, aus den Praekallikreinen einiger Organe und des Serums freigesetzt. Die Praekallikreine der Organe findet man intrazellulär zu etwa 80 %

in der Mikrosomen- und Zytoplasmafraktion, zu 20 % in der Mitochondrienfraktion (SIEBERT et al., 1955). Zusammen mit Trypsinogen, Chymotrypsinogen und dem spezifischen Trypsin-inhibitor wird das Praekallikrein ins Duodenum sezerniert (FRITZ et al., 1967), wo es durch Trypsin zu Kallikrein aktiviert wird. Zur Bestimmung der Praekallikreine werden Organextrakte oder Körperflüssigkeiten 20 min. lang mit Trypsin inkubiert, welches das Kallikrein freisetzt. Danach wird ein aus Sojabohnen gewonnener Trypsininhibitor zugesetzt, der die Wirkung des Trypsins aufhebt, nicht aber die des freigesetzten Kallikreins. Biologisch läßt sich dann am Blutdruck des narkotisierten Hundes die Menge des Praekallikreins indirekt auf dem Wege über das aktivierte Kallikrein bestimmen (WERLE et al., 1955).

Die Molekulargewichte der in den Organen vorkommenden Kallikreine liegen zwischen etwa 23 000 und 36 000 Daltons (Abb. 1). Dagegen besitzen die Kininogenasen des Serums mit etwa 97 000 Daltons ein wesentlich höheres (FIEDLER et al., 1970; ZUBER und SACHE, 1974). Kallikreine sind Glykoproteine, die außer Aminosäuren auch noch 6 - 7 % Sialinsäure, Aminozucker und Hexosen enthalten. Nach FRITZ et al. (1967) besteht Pankreaskallikrein aus 288 Aminosäuren (= 93,7 %), 6 - 7 Glukosaminmolekülen (= 2,9 %) und 7 Hexosemolekülen (= 3,4 %) (Abb. 1). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen KUTZBACH und SCHMIDT-KASTNER (1972) und ZUBER und SACHE (1974). Die Kallikreine sind sowohl in Wasser, wäßrigem Äthanol und wäßrigem Aceton als auch in Flüssigkeiten mit hoher Dielektrizitätskonstante, z.B. Formamid oder Ameisensäure, löslich. Aus den Lösungen lassen sie sich durch Äthanol und Aceton fällen, wenn deren Konzentration 50 Vol% überschreitet. Es tritt dabei eine irreversible Denaturierung auf,

die thermisch bedingt ist. Man kann diese verhindern, indem man die Fällungen unter hinreichender Kühlung vornimmt. Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes vom Kallikrein ergab Werte, die sich im pH-Bereich von 3,5 bis 4,2 bewegen (FIEDLER et al., 1970).

	Pankreaskallikrein		Harnkali- krein	Submandibularis- kallikrein
	Präparat nach (1)	Präparat nach (2)	Präparat nach (3)	Präparat nach (3)
	Mol/Mol	Mol/Mol	Mol/Mol	Mol/Mol
Lys	13	12	16	16
His	10	10	10	10
Arg	4	4	8	4
Asp	33	35	31	32
Thr	18	22	21	18
Ser	17	20	20	23
Glu	28	30	29	25
Pro	20	26	27	21
Gly	27	28	24	23
Ala	16	20	16	11
Cys 1/2	10	12	10	8
Val	13	12	15	22
Meth	5	3	4	2
Ileu	14	13	12	14
Leu	24	24	24	44
Tyr	9	9	8	5
Phe	13	12	11	6
Try	9	9	8	5
Glukosamin	6	8	10	6
Galaktosamin	0	2	5	3
Hexosen	7	5	10	0
Molekular- gewicht	33300	34600	36300	32800

Abb. 1: Bausteinanalyse der Kallikreine aus Pankreas, Harn und Gl. submandibularis.

Präparat nach (1) war Pankreaskallikrein vom Schwein (FRITZ et al., 1967), Präparat nach (2) war ebenfalls Pankreaskallikrein vom Schwein (TRAUTSCHOLD, 1965), die Präparate nach (3) waren Harnkallikrein und Submandibulariskallikrein aus Schwein (ROEDER, 1968). Abbildung modifiziert nach FREY et al. (1968).

Die Kallikreinaktivität läßt sich sowohl im biologischen als auch im photometrischen Test bestimmen. Biologischer Test ist die Hypotension beim narkotisierten Hund. Als biologische Kallikreineinheit ist diejenige Menge Kallikrein definiert, die denselben Blutdruckabfall in der Art. carotis des Hundes hervorruft wie 5 ml Harn eines gesunden Menschen, von dem 50 l gesammelt und 24 Stunden lang gegen fließendes Wasser dialysiert worden waren. Standard nach FREY et al. (1950). Inzwischen ist es möglich, eine im Handel erhältliche Standardkallikreinelösung (PADUTIN, BAYER) zum Vergleich heranzuziehen (FREY et al., 1950). Als biochemische Kallikreineinheit wird diejenige Menge Kallikrein angesehen, die 1 μ Mol Benzoylargininäthylester pro Minute unter Standardbedingungen umsetzt (TRAUTSCHOLD, 1965). Bei diesem photometrischen Test verfolgt man die esterolytische Spaltung des Substrates indirekt im gekoppelten Test über das Alkoholdehydrogenase/NAD-System bei 366 nm (WERLE, 1959).

Weitere Bestimmungsmethoden sind die Messung der Esterolyse durch Titration, die colorimetrische Bestimmung des Hydroxamsäure-Eisen (III)-Komplexes mit Benzoylargininäthylester vor und nach der Reaktion (HESTRIN, 1949) und die Messung der Extinktionsänderung bei 253 nm (Differenzspektrum von freiem Benzoylarginin und seinem Äthylester) (TRAUTSCHOLD, 1961).

Im Gegensatz zu Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin besitzen alle Kallikreine eine hohe Substratspezifität. Ihre proteolytische Aktivität besteht nur gegenüber wenigen Proteinen, den Kininogenen, von denen es im Humanplasma drei und im Rinderplasma zwei gibt (High Molecular Weight - Kininogen ca. 70 000 Daltons, LMW-Kininogen ca. 50 000) (JACOBSEN und KRIZ, 1967). Die aus Organen und Urin gewonnenen Kallikreine spalten Kininogen zwischen den Aminosäureresten Methionin und Lysin und liefern damit das Kallidin (WERLE, 1968). (Abb. 2).

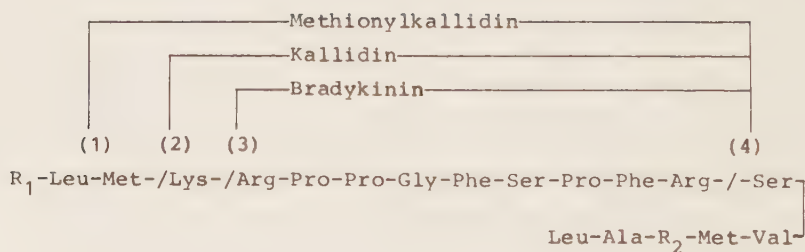


Abb. 2: Teilsequenz von Kininogen aus Rinderserum.

Die Spaltung des Kininogens erfolgt zwischen Met-Lys (2) und Arg-Ser (4) und liefert das Kallidin. Durch Trypsin wird Bradykinin (3 bis 4) abgespalten, aber auch Methionylkallidin (1 bis 4). Nach der von HABERMANN (1966) ermittelten Sequenz ist es bemerkenswert, daß die Kinine im Kininogen nicht endständig sind, sondern innerhalb des Proteins vorkommen.

Plasmakallikrein dagegen liberiert aus Kininogen das Bradykinin, indem es, wie Trypsin und Schlangengiftproteasen, die Kininogenkette zwischen dem Lysin- und Argininrest spaltet (ROCHA E SILVA, 1949). Außerdem wird zugleich die Arg-Ser-Bindung des Kininogens von den Kallikreinen gespalten (Abb. 2). Die Inkubation verschiedener Aminosäureester mit Kallikreinen ergab, daß Benzoylargininäthylester (BAEE) von allen geprüften Derivaten dieser Substanzklasse am schnellsten gespalten wird. Benzoylargininnaphthylamid und Benzoylarginin-p-nitroanilid, die als typische synthetische Substrate für Trypsin gelten, werden zwar von Plasmakallikrein gespalten, von Pankreas-, Harn- und Submandibularisdrüsenkallikrein dagegen nur mit äußerst niedriger Geschwindigkeit (FIEDLER, 1968).

Vom Bau des enzymatisch aktiven Zentrums des Kallikreins weiß man noch relativ wenig. Diisopropylfluorophosphat (DFP) hebt die enzymatische Aktivität des Kallikreins auf (FIEDLER et al., 1969). Sie konnten nachweisen, daß bei der Umsetzung mit radioaktiv markiertem (^{32}P) DFP im Schweinepankreas-kallikrein nur ein einziger Serinrest von 17 vorhandenen phosphoryliert wurde, während gleichzeitig die enzymatische Aktivität verloren ging. Dieser Serinrest befand sich damit wahrscheinlich im aktiven Zentrum des Enzyms, das damit in die Gruppe der "Serin-Hydrolasen" eingereiht werden konnte (FIEDLER et al., 1969). In einem weiteren Experiment (FIEDLER et al., 1971) wurden Schweinepankreas-kallikrein und Trypsin mit Diisopropylfluoro(^{32}P)phosphat behandelt. Die nachfolgende partielle Hydrolyse mit halbkonzentrierter Salzsäure lieferte Bruchstücke, deren Trennung durch Hochspannungselektrophorese vorgenommen wurde. Das erhaltene Autoradiogramm ließ zwölf Banden erkennen, deren Wanderungsgeschwindigkeit bei beiden Präparaten übereinstimmte. Bei der Mehrzahl der radioaktiven Banden handelt

es sich um verschiedene Derivate der am Serin phosphorylierten Sequenz Asp-Ser-Gly. Da die Banden gleichweit gewandert waren, wurde gefolgert, daß das aktive Zentrum des Kallikreins identisch sei mit dem des Trypsins: Asp-Ser-Gly. Diisopropylfluorophosphat greift die Praekallikreine nicht an, so daß die OH-Gruppe des Serins - wie im Trypsinogen - geschützt zu sein scheint (HABERMANN, 1962; KAGEN, 1964).

Außerdem wird die enzymatische Aktivität durch aminogruppenblockierende Reagenzien aufgehoben: Ninhydrin, Formol, Benzaldehyd, Phenylsenföl und Benzoylchlorid. Daraus ließe sich schließen, daß Aminogruppen im aktiven Zentrum eine wesentliche Rolle spielen (BISCHOFF und ELLIOT, 1937; WERLE und FLOSDORF, 1938). Auch durch Oxydationsmittel läßt sich die Wirkung des Kallikreins aufheben (WERLE, 1936; WERLE und APPEL, 1956). Durch nachfolgende Reduktion läßt sie sich allerdings wieder zurückgewinnen (WERLE, 1936; WERLE und APPEL, 1956).

1.3 BIOCHEMIE DES BREITSPEZIFISCHEN PROTEINASE-INHIBITORS AUS RINDERORGANEN (KALLIKREIN-TRYPSIN-INHIBITOR, KTI, APROTININ, TRASYLOL)

Aprotinin läßt sich durch verschiedene Verfahren isolieren: KRAUT et al. (1930) gewannen den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Lymphknoten und Ohrspeicheldrüsen des Rindes durch Extraktion mit M/50 Essigsäure und anschließender fraktionierter alkoholischer Fällung. GARDNER et al. (1944) behandelten das homogenisierte Gewebe mit Trichloressigsäure, KRAUT et al. (1960) fällten den Inhibitor mit Magnesiumsulfat aus. Zur weiteren Reinigung wurde vielfach die Säulenchromatographie eingesetzt, wobei sich CM-Cellulose besonders eignete. Seit 1966 wurden von FRITZ et al. die Affinitätschromatographie zur Reinigung von Aprotinin eingesetzt.

Der Inhibitor wurde dabei an ein Maleinsäure-Äthylen-Kopolymeres spezifisch gebunden. Die im gepufferten Organextrakt enthaltenen Begleitproteine und -peptide wurden aus der Säule mit kochsalzhaltigem Puffer bei neutralem pH herausgewaschen, der Inhibitor danach mit einer Lösung von 0,01 M HCl und 0,3 M KCl vom Trypsinharz abgespalten und eluiert. Durch dieses einzelne Verfahren wurde ein nahezu analysenreines Präparat erhalten.

Der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor besteht aus 58 Aminosäuren (GREEN und WORK, 1953). Aus der Bausteinanalyse (Abb.3) errechnet sich ein Molekulargewicht von 6513 Daltons, das mit dem bei Sephadex-Gelfiltration (6700 ± 200 Daltons (FRITZ et al., 1965)) hervorragend übereinstimmt. Im Gegensatz hierzu ermittelten KRAUT et al. (1960) aus der Sedimentationskonstanten $s_{20,w} = 1,32 \times 10^{-13}$ sec und der Diffusionskonstanten $D_{20,w} = 11,0 \times 10^{-7}$ cm²/sec ein Molekulargewicht von 11 600 - 11 700 Daltons. Diese Befunde lassen sich eventuell dadurch erklären, daß der Inhibitor bei den verwendeten Verfahren als Dimeres vorliegt. Dafür gibt es aber bis heute keinen sicheren Anhaltspunkt.

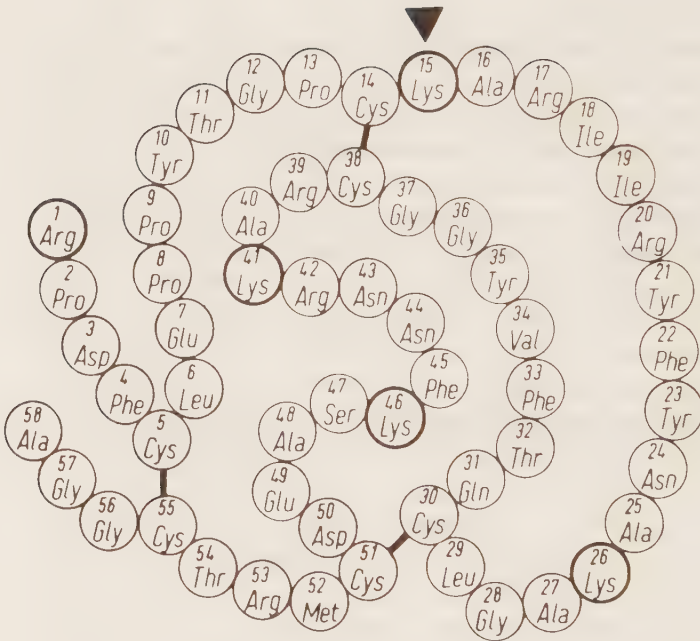


Abb. 3: Primärstruktur des breitspezifischen Kallikrein-Trypsin-Inhibitors aus Rinderorganen (Aprotinin).
Nach G. SCHNELLS (1971).

Das Inhibitormolekül besitzt von den geläufigen Aminosäuren kein Histidin und Tryptophan. An basischen Aminosäuren enthält es vier Lysin- und sechs Argininreste, an sauren Aminosäuren fünf Asparaginsäure- und drei Glutaminsäurereste. Unter der Berücksichtigung, daß vier Säureamidgruppen vorliegen, ergibt sich ein Verhältnis von basischen zu sauren Aminosäuren von zehn zu vier. Daraus resultiert der stark basische Charakter des Inhibitors. In protonisierter Form liegt er in Lösungen bis zu pH 11,5 vor und wandert bei neutralem pH im elektrischen Feld zur Kathode.

Die Aminosäuresequenz des Inhibitors aus Rinderpankreas wurde von B. KASSELL et al. (1965) veröffentlicht, die des Inhibitors aus Rinderlunge und -parotis von ANDERER und HÖRNLE (1965). Die Sequenzen, die von beiden Arbeitsgruppen gefunden wurden, stimmten miteinander vollständig überein. Eine weitere Sequenz wurde von DLOUHA et al. (1965) angegeben, bei der in Position 19 der Sequenz ein Isoleucinrest fehlt. In der von J. CHAUVET et al. (1966) publizierten Sequenz erscheint der Arginin-42-Rest in Position 21. Es wurden Präparate der Firmen Worthington und Bayer benutzt.

Die Identität aller aus Rinderorganen dargestellten Kallikrein-Trypsin-Inhibitoren hatte man schon früher vermutet, da die aus verschiedenen Organen gewonnenen Inhibitoren ein gleiches Hemmspektrum besaßen, gleiche Hitze- und Säurestabilität aufwiesen, in den Molekulargewichten übereinstimmten und im elektrischen Feld alle zur Kathode wanderten. Auch die Disulfidbrücken nahmen in allen aus Rinderorganen isolierten Inhibitoren dieselbe Lage ein (ANDERER und HÖRNLE, 1965 und 1966).

Untersuchungen zur Frage des reaktiven Zentrums im Inhibitormolekül ergaben, daß die ϵ -Aminogruppe des in Position 15 befindlichen Lysins für das Hemmvermögen des Inhibitors von

ausschlaggebender Bedeutung ist (CHAUVET und ACHER, 1967). Aprotinin und das mit Trypsin umgesetzte Aprotinin (Komplex) wurden mit dem N-Carboxyanhydrid von Alanin umgesetzt. Nach Oxydation mit Perameisensäure und tryptischer Spaltung wurden die Bruchstücke zweidimensional chromatographiert. Nicht-alanierter Kallikrein-Trypsin-Inhibitor wurde ebenfalls tryptisch gespalten, und die erhaltenen Peptide wurden gleichfalls zweidimensional chromatographiert. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abb. 4 dargestellt:

1. Die tryptische Spaltung des nativen Aprotinins (A) lieferte 9 Peptide, das vollständig alaniierte Produkt (B) 6 und der im Komplex alaniierte Inhibitor (C) 7 Spaltstücke.
2. Das Lysin in Position 15 wurde im Trypsin-Aprotinin-Komplex nicht alaniiert. Deshalb konnte dieses Derivat des Aprotinins vom Trypsin an der Lysyl-Alanin-Bindung (Position 15 - 16) gespalten werden. Dieser Lysinrest war an der Wechselwirkung zwischen Inhibitor und Trypsin während der Komplexbildung beteiligt und befand sich somit im sog. "reaktiven Zentrum." So konnte er sich der Alanierung entziehen.

Die Rolle der Disulfidbrücken im Aprotinin wurde vor allem im Arbeitskreis von M. LASKOWSKI, Sr. untersucht. Nachdem es A. LIGHT und N.K. SINHA (1967) gelungen war, mit NaBH_4 zwei Sulfidbrücken des Trypsins selektiv zu reduzieren, ohne dadurch einen Verlust an enzymatischer Aktivität hervorzurufen, versuchten KRESS und LASKOWSKI, Sr. (1967, 1968), ob sie beim Aprotinin einen ähnlichen Effekt erzielen und die Hemmwirkung erhalten könnten.

Sie fanden bei der quantitativen Bestimmung der Sulfhydrylgruppen, daß nach etwa 1/2 - 6-stündiger Einwirkung von NaBH_4 auf Aprotinin nur 2 Sulfhydrylgruppen nachweisbar waren. Nur eine der drei Disulfidbrücken ließ sich spalten. Dies ließ den Schluß zu, daß das Aprotininmolekül eine kompakte Tertiärstruktur besitzt, so daß mit NaBH_4 nur eine Disulfidbrücke, die sich vermutlich in der Nähe der Oberfläche des Moleküls befindet, reduktiv gespalten werden kann. Der so modifizierte Inhibitor war aber noch voll inhibitorisch wirksam. Reagierte aber das partiell reduzierte Aprotinin mit Jodessigsäure, so war es gegenüber Trypsin und Chymotrypsin völlig inaktiv.

A)

-Lys	-Arg	-Arg	-Lys	-Arg	-Arg	-Lys	-Arg	
<u>1..15</u>	<u>16..17</u>	<u>18..20</u>	<u>21..26</u>	<u>27..39</u>	<u>40..42</u>	<u>43..46</u>	<u>47..53</u>	<u>54..58</u>
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX

B)

ala		ala		ala		
<u>1..Lys...17</u>	<u>18..20</u>	<u>21..Lys....39</u>	<u>40..42</u>	<u>43..Lys....53</u>	<u>54..58</u>	
I	II	III	IV	V	VI	

C)

			ala		ala	
<u>1..15^X</u>	<u>16..17</u>	<u>18..20</u>	<u>21..Lys....39</u>	<u>40..42</u>	<u>43..Lys....53</u>	<u>54..58</u>
I	II	III	IV	V	VI	VII

A) 9 tryptische Peptide des oxydierten, nativen Inhibitors

B) 6 tryptische Peptide des oxydierten und alanierten Inhibitors

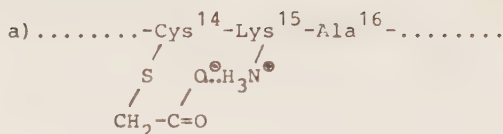
C) 7 tryptische Peptide des oxydierten und im Trypsinkomplex alanierten Inhibitors

Abb. 4: Tryptische Spaltung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors und seiner alanierten Derivate.

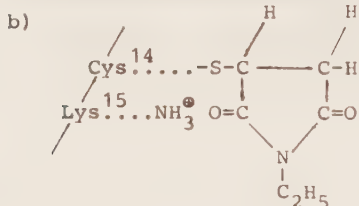
Die Endopeptidase Trypsin spaltet spezifisch C-terminal von den Aminosäuren Lysin und Arginin. Ist die Aminosäure Lysin chemisch verändert worden, - in diesem Falle durch Alanierung an der ϵ -Aminogruppe des Lysins, - so erfolgt keine Spaltung. X = reaktives Zentrum. An dieser Stelle konnte die ϵ -Aminogruppe des Lysins nicht alaniert werden, da sie durch das aktive Zentrum des Trypsins (im Komplex) geschützt wurde.

Mit dem so modifizierten Inhibitor wurde eine tryptische Spaltung durchgeführt. Die Analyse der Bruchstücke ergab, daß die Reste Cys (14) und Cys (38) carboxymethyliert worden waren und damit den durch NaBH_4 freigelegten Sulfhydrylgruppen entsprachen. Damit war der selektiv reduzierte Inhibitor gegenüber Trypsin und Chymotrypsin inhibitorisch aktiv, der durch Jodessigsäure und andere Sulfhydrylreagenzien modifizierte Inhibitor aber nicht. Dieser Befund wurde so gedeutet, daß sich im Falle der Carboxymethylierung zwischen der positiv geladenen ϵ -Aminogruppe vom Lysin (15)-Rest zur negativ geladenen Carboxylgruppe der benachbarten Carboxymethylgruppierung eine zwitterionische Bindung ausbilden konnte, die die Komplexbildung mit Trypsin und Chymotrypsin (Abb. 5 a) verhinderte.

Jodessigsäure



N-Äthylenmaleinsäureimid



Jodacetamid



Äthylenimin

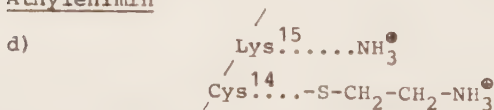


Abb. 5: Umsetzung der Sulfhydrylgruppe im Cys¹⁴ des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (Aprotinin) nach Spaltung der Disulfidbrücke mit NaBH₄ mit verschiedenen Sulfhydrylreagenzien.

Diese Ansicht wurde dadurch bestätigt, daß raumbeanspruchende Substituenten dieselbe präventive Wirkung auf die Komplexbildung mit Trypsin hervorrufen, z.B. die Umsetzung mit N-Äthylenmaleinsäureimid. Wurden dagegen die reduzierten Cys (14,38) - Reste mit dem ungeladenen Jodacetamid ($\text{J-CH}_2\text{-CO-NH}_2$) carboxyamidomethyliert, so behielt der Inhibitor seine inhibitorische Aktivität bei. Nach obiger Annahme konnte es mit der nichtgeladenen Carboxyamidogruppe nicht zur Ausbildung einer zwitterionischen Struktur kommen (Abb.5c) Dasselbe galt für die Substitution der Cys (14,38)-Reste mit positiv geladenen Gruppen, wie z.B. bei der Substitution mit der Aminoäthylgruppierung durch Reaktion mit Äthylenimin (Abb. 5 d).

Die selektive Reduzierung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors durch NaBH_4 führte nicht zu einer irreversiblen Veränderung des Moleküls. Die Reoxydation der beiden Sulfhydrylgruppen zur Disulfidbrücke (14/38) erfolgte aber relativ langsam (bei pH 8,0 und 25°C in 5 min zu 22 %, in 25 min zu 38 % (KRESS und LASKOWSKI, 1967)).

Im Komplex mit Trypsin ließ sich jedoch innerhalb von 25 min keine Reoxydation nachweisen. Es ist anzunehmen, daß entweder durch eine Konformationsänderung die Sulfhydrylgruppen von Cys (14) und Cys (38) räumlich von einander getrennt gehalten werden oder daß sie für die Reoxydation innerhalb des Komplexes aus sterischen Gründen nicht erreichbar sind und dadurch der reduzierte Status des Inhibitors stabilisiert wird.

Neben dem Lysinrest (15) und der Disulfidbrücke (14/38) spielt aber noch der Alaninrest (16) im reaktiven Zentrum des Inhibitors eine wichtige Rolle. Das an den Cysteinresten 14 und 38 mit Jodacetamid substituierte Aprotinin

zeigt wie die spezifischen Trypsininhibitoren aus Pankreas und Samenblasen temporäres Hemmverhalten gegenüber Trypsin (KRESS et al., 1968). Dabei wird die Bindung zwischen Lysin 15 und Alanin 16 im Komplex im Verlaufe einiger Stunden langsam gespalten; der modifizierte Kallikrein-Trypsin-Inhibitor verliert zugleich seine inhibitorische Aktivität. Dies spricht dafür, daß die Lysin(15)-Alanin(16)-Sequenz das Hemmzentrum des Inhibitors gegenüber Trypsin darstellt. Aller Wahrscheinlichkeit nach lagert sich der Lysin(15)-Rest an das aktive Zentrum des Trypsins an, wobei es nur im modifizierten, nicht aber im nativen Molekül zur Spaltung der Lysyl-Bindung kommt (KRESS et al., 1968).

Die mit Trypsin und Aprotinin erhobenen Befunde wurden für Chymotrypsin von KRESS et al. (1968), für Kallikrein und Plasmin in gleicher Weise bestätigt. Dies war zu erwarten, da alle vier Enzymgruppen hinsichtlich ihrer Gruppenspezifität sehr ähnlich sind. Sie spalten Peptidketten carboxylständig von Lysin und Arginin. Alle gemachten Röntgenstrukturanalysen (HUBER et al., 1974) haben diese Befunde bestätigt. Die proteolytischen Enzyme treten mit demselben Hemmzentrum im Kallikrein-Trypsin-Inhibitor in Wechselwirkung, der Sequenz Lys(15)-Ala(16). Dabei wurden räumlich begünstigte Wechselwirkungen zwischen einzelnen Gruppen am Inhibitor und den Enzymen beobachtet (HUBER et al., 1971). Unter Benutzung von Modellen fanden HUBER, BLOW und CREIGHTON (1972), daß die Lys(15)-Ala(16)-Sequenz des Inhibitors sich bei der Komplexbildung im Bereich des katalytischen Zentrums des Chymotrypsins Ser(195) und His(57) befindet. Der Inhibitor und das Chymotrypsin besitzen im Bereich des Kontaktgebietes ausgesprochene komplementäre Strukturen, die eine Komplexbildung ohne wesentlichen Energieaufwand ermöglichen (BLOW et al., 1972).

1.4 PHARMAKOLOGIE UND PATHOPHYSIOLOGIE DES KALLIKREIN-KININ-SYSTEMS UND SEINER INHIBITOREN

1.4.1 Pharmakologie

Wie schon oben dargelegt, beruht die Wirkung der Kallikreine in erster Linie auf ihrer enzymatischen Fähigkeit, aus Kininogen Kinine freizusetzen. Im Organismus, nämlich in vivo, besteht qualitativ kein Unterschied zwischen der Wirksamkeit der Kallikreine und Kinine (WERLE und GRUNZ, 1939). Pharmakodynamisch bestehen jedoch quantitative Unterschiede zwischen den beiden Stoffen, da die Kinine durch Carboxypeptidasen und andere Blutkininasen rasch abgebaut werden. Die Wirkung des injizierten Kallikreins andererseits ist, was die Zeitdauer und Intensität betrifft, abhängig von dem Vorrat an Kininogen im Organismus, der Abbaugeschwindigkeit der Kinine und der Hemmung des Kallikreins durch Inhibitoren. Man kann die Wirkung des Kallikreins protahieren, indem man das Kallikrein an den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen bindet. Im Organismus erfolgt dann eine langsame Spaltung des Komplexes (KRONENBERG et al., 1965), wobei das laufend liberierte Kallikrein aus dem im Plasma vorhandenen Kininogen Kinine freisetzt. Fehlen größere Kininogenmengen, wie im Falle von isolierten Testorganen, so ist das Kallikrein wegen Substratmangel fast unwirksam. Somit ist die Kininogen-, Kallikrein- und Inhibitorkonzentration im Plasma, Gewebe oder in der Badflüssigkeit für die Geschwindigkeit der Kininfreisetzung von primärer Bedeutung (KRONEBERG und STOLPEL, 1963).

Die pharmakologischen Effekte der Kinine beruhen in erster Linie auf vier biologischen Wirkungen:

1. Vasodilatation der Mesoarteriolen und Präkapillaren (BOISSONNAS et al., 1960). Sie führt zur Erniedrigung des peripheren Widerstandes mit nachfolgendem Blutdruckabfall.
2. Steigerung der Permeabilität der Kapillaren. Ihre Folge ist die Ausbildung von Ödemen und eine Leukozytenmigration.
3. Kontraktion der glatten Muskulatur. Sie führt zum Bronchospasmus, zu Magen-Darm-Krämpfen (ELLIOTT et al., 1960) und zur Uteruskontraktion.
4. Erregung von Schmerzrezeptoren. Sie führt zu einem starken, brennenden Schmerz, vor allem an der Haut.

An einzelnen Wirkungen wurde beobachtet: Die glatte Muskulatur isolierter Blutgefäße, z.B. der Aorta, wird kontrahiert. Die Coronargefäße werden durch Kinine erweitert (ROCHA E SILVA, 1962, 1963), ebenso Gefäße der Haut (FOX et al., 1961). Die Skelettmuskulatur und das Gehirn werden vermehrt durchblutet (CARPI und CORRADO, 1961).

Der isolierte Rattenuterus (HABERMANN, 1961) erwies sich als eines der empfindlichsten Organe gegenüber Kininen. Er wird daher oft zum quantitativen Kininnachweis benutzt. Mengen von nur 0,1 bis 1,0 ng lassen sich noch nachweisen. Die Injektion von Bradykinin bei Ratten führt zur Erhöhung der Peristaltik der Ureteren (CERLETTI et al., 1961).

Das Herzminutenvolumen wird durch Kinininjektionen beim Hund (MAXWELL et al., 1962) erheblich vergrößert. Kinine rufen ferner einen kurzzeitigen Schmerz hervor, wenn man in eine

Cantharidenblase Kallidin oder Bradykinin injiziert (ARM-STRONG et al., 1954). Man hat dieses Phänomen zum qualitativen und quantitativen Kininnachweis herangezogen (ELLIOTT et al., 1960). Gereinigtes Pankreaskallikrein erzeugt bei intrakutaner Applikation ebenfalls Schmerz (HABERMANN, 1963), Bradykinin wirkt vehementer. Durch Vorbehandlung mit Serotonin wird die Wirkung von Bradykinin, Kallidin und Kallikrein erhöht (SICUTERI et al., 1965). Im Falle des Bradykinins kommt es bei i.v.-Injektion am Handrücken zu fast unerträglichen Schmerzen im Arm.

Die Wirkung der Kinine läßt sich am isolierten Meerschweinchendarm durch Zusatz von Chymotrypsin potenzieren. Trypsin und Chymotrypsin wirken in gleicher Weise (EDERY, 1964, 1965). Die Ursache dieser Wirkung sind Peptide, die die Wirkung von Kininen steigern. Auch Peptide, die bei der Aktivierung des Fibrinogens durch Thrombin abgespalten werden, und teilgereinigte Extrakte aus Schweineleber erhöhten die Wirkung von Bradykinin am isolierten Rattenuterus (TEWKSBURY und STAHMANN, 1965). Schließlich konnten aus Schlangengiften zwei Bradykinin potenzierende Faktoren isoliert werden (GRAEFF et al., 1965).

Bis heute gibt es leider keine spezifischen Rezeptorantagonisten, was die Aufklärung der physiologischen Funktion der Kinine leider sehr erschwert hat. Substanzen mit Antikininwirkung sind aber Phenylbutazon, Acetylsalizylat (Aspirin^R) und Amidopyrin (GJURIS et al., 1964).

1.4.2 Pathophysiologie

Die klinischen Symptome der pharmakologischen Wirkungen von Kininen entsprechen der denen der Entzündung: Gefäßerweite-

rung, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Leukozytenemigration und Schmerz. Es ist daher anzunehmen, daß die Kinine an Entzündungsprozessen beteiligt sind. Dabei geht die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems mit der des Blutgerinnungssystems Hand in Hand. Der Hageman-Faktor, in der Blutgerinnung als Faktor XII bekannt, bewirkt unter anderem auch eine Freisetzung von Kallikrein aus Kallikreinogen. Dieses liberiert Kinine, die durch Erhöhung der Kapillaraktivität den Zufluß von Plasmaproteinen in das entzündliche Gebiet ermöglichen. Der einganggesetzte Gerinnungsmechanismus führt schließlich zur Ablagerung von Fibrin und riegelt damit den geschädigten Bezirk ab. Das zugleich anwesende Plasmin (=Fibrinolysin) sorgt andererseits wieder dafür, daß die Poren nicht ständig geschlossen bleiben. Die entgegengesetzten Wirkungen des Kallikreins und des Plasmins sorgen damit für die Wiederherstellung der Gewebshomöostase (WEBSTER et al., 1965). Auch bei thermischen Insulten, die als eine Spezialform von Entzündung aufgefaßt werden können, wurde eine Freisetzung von Kininen beobachtet (ROCHA E SILVA und ROSENTHAL, 1961).

Ruft man an der Pfote der Ratte durch Injektion von Serotonin ein Ödem hervor, so findet man in der Ödemflüssigkeit ebenfalls Kinine. Durch prophylaktische und kurative i.v.-Gaben des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors (Aprotinin) kann man die Ausbildung solcher Ödeme hemmen.

Leukozyten enthalten ebenfalls Kininogenasen und Kininasen. So wurde innerhalb von 5 min bei Zusatz von menschlichen Leukozyten zu Humanplasma ein 2- bis 3-facher Anstieg der Kininkonzentration konstatiert, bei gleichzeitigem Kininogenabfall. Derselbe Effekt wurde bei Inkubation von Leukozyten mit gereinigtem Kininogen beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, daß die Kininogenase in den Lysosomen von Rinderleukozyten lokalisiert ist (FRIMMER, 1966).

Außerdem wird in vitro die Fähigkeit der Leukozyten zur Phagozytose gegenüber Bakterien durch sehr niedrige Bradykiningaben erhöht (LUDANY et al., 1967).

Das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis ist vielgestaltig. Das zeigt sich besonders deutlich an den zahlreichen Möglichkeiten des Auftretens von verschiedenen Symptomgruppierungen, wie Schock, Schmerz, Verdauungsinsuffizienz, akuter Abdomen etc.. Durch Behandlung mit Aprotinin konnte die Funktion des Kreislaufs bei dieser Krankheit gebessert und der Schmerz erfolgreich bekämpft werden. Diese Tatsache ist vermutlich auf eine Hemmung der lokalen Kininfreisetzung zurückzuführen. Die erhöhte Gefäßpermeabilität und die Erweiterung der Kapillaren durch die Kinine sind für das sich ständig verstärkende pathologische Geschehen mitverantwortlich. Jedenfalls konnte in einer sorgfältig kontrollierten Studie jetzt gesichert werden, daß Aprotinin bei der akuten Pankreatitis des Menschen eine therapeutische Wirkung besitzt (TRAPNELL et al., 1974).

Bei Störungen der Blutgerinnung und Fibrinolyse wird das Kallikrein-Kinin-System aktiviert. Dabei spielt nicht nur der Hageman-Faktor (FREY, 1953) eine Rolle, sondern auch das Plasmin und Thrombin, die sich in ihren Funktionen wechselseitig beeinflussen. Plasmin wirkt dabei nicht nur als eine schwache Kininogenase, sondern liberiert auch aus Praekallikrein Kallikrein. Beide Prozesse werden durch Kallikrein-Trypsin-Inhibitor Aprotinin gehemmt (Abb. 6). Daraus ergibt sich eine der therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten des breitspezifischen Inhibitors, sowohl bei primär bedingten Hyperfibrinolyse, als auch bei den sekundären, die durch Verbrauchskoagulopathie entstehen und den dadurch ausgelösten Blutungen (MARX et al., 1959; MÜLLER-BERGHaus et al., 1972). Die therapeutische Verwertbarkeit des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors erstreckt sich wegen seiner anti-

fibrinolytischen Wirkung auch auf alle jene Krankheitszustände, in denen das relativ labile Gleichgewicht zwischen dem fibrinolytischen und thromboplastischen System gestört ist. Das natürliche Inhibitorsystem im Blut reicht dann nicht aus, um für eine entsprechende Regulation der ablaufenden proteolytischen Prozesse zu sorgen.

Auslösende Faktoren:

Hitze, Bestrahlung, toxische Metabolite,
Trauma, Entzündung, Toxine

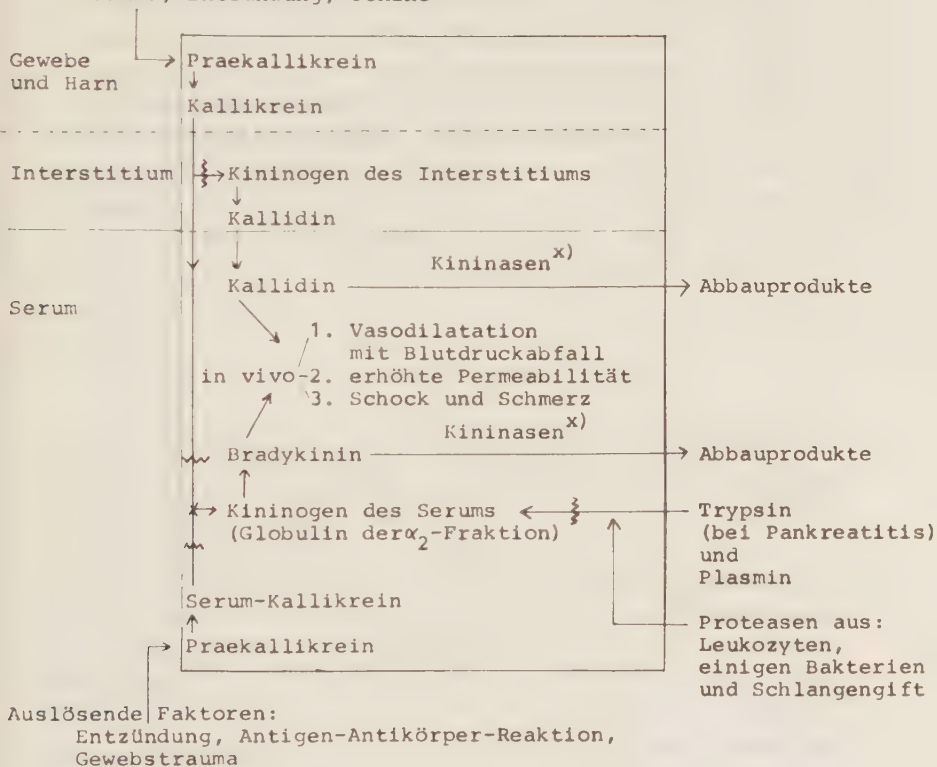


Abb. 6: Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems und Angriffsorte zur Hemmung seiner Aktivierung mit Aprotinin (Trasylol).

Schließlich verwendet man Aprotinin noch als Antidot in der thrombolytischen Therapie mit Streptokinase, dem Fibrinolysin der Streptokokken.

In den Gerinnungsvorgang kann man auch mit dem Kallikrein-Trypsin-Inhibitor eingreifen. Die dazu notwendigen Dosen sind jedoch dreimal höher als diejenigen, die für die Einwirkung auf fibrinolytische Prozesse erforderlich sind. Im Falle der Einwirkung auf das Blutgerinnungssystem erfolgt der Angriff nicht direkt auf das Thrombin, sondern auf die Hemmung der Serumfaktoren, wobei die Bildung der aktiven Blutthrombokinasen eingeschränkt wird. Diese Wirkung des TRASYLOLS^R ist aber bis heute mehr von theoretischem Interesse.

2. Z I E L E D E R A R B E I T

1. Der breitspezifische Kallikrein-Trypsin-Inhibitor aus Rinderorganen besitzt wegen seiner Hemmwirkung auf zahlreiche körpereigene Proteasen beachtliches klinisches Interesse. Seine Wirksamkeit als Medikament läßt sich bisher aber nur in wenigen Fällen sichern und in befriedigendem Ausmaße nachweisen. Durch chemische Modifizierung des Moleküls sollten deshalb Derivate synthetisiert werden, die sich pharmakodynamisch und pharmakokinetisch günstiger verhielten als der native Inhibitor.
2. Zu diesem Zwecke sollte Aprotinin unter milden Bedingungen mit folgenden Reagenzien umgesetzt werden:
 - 2.1 mit N-Carboxyanhydriden von Glutaminsäure, Serin und Alanin, um die Basizität des Inhibitors zu verändern,
 - 2.2 mit Äthandial an Albumin gekoppelt werden, um ein grösseres und damit schwerer ausscheidbares Molekül zu erhalten,
 - 2.3 mit zyklischen Anhydriden im Trypsinkomplex in die entsprechenden Acylderivate überführt und anschließend

das reaktive Zentrum durch milde Hydrolyse wieder freigelegt werden und

- 2.4 mit Homocysteinethiolacton und SH-Reagenzien chemisch modifiziert und seine Eigenschaften bestimmt werden.
3. Nach Synthese der Derivate sollten ihre chemischen Eigenschaften, die Ausbeute der Reaktion, das Hemmverhalten gegenüber verschiedener Proteasen und ihre Verteilung in verschiedenen Kompartimenten des tierischen Organismus geprüft werden.

3. M A T E R I A L U N D M E T H O D I K

3.1 MATERIAL

Die Versuche über die Verteilung von Aprotinin und den modifizierten Inhibitoren wurden an üblichen Wistarratten (200 g) durchgeführt. Die Tiere erhielten Altromin^R als Standardfutter und Leitungswasser.

Entnahme der Organe, Harngewinnung, Serumgewinnung etc:

Die Ratten wurden gewogen und erhielten anschließend den in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Inhibitor aus Rinderorganen, bzw. seine Derivate in einer Dosierung von 7 000 ImU/kg Körpergewicht in die Schwanzvene injiziert. Unverträglichkeitsreaktionen wurden nicht beobachtet. Jeweils 2 min, 15 min, 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach Injektion wurden die Tiere durch Dekapitation entblutet. Das Blut wurde in Zentrifugengläsern aufgefangen. Folgende Organe wurden nach Lapara- und Thorakotomie exstirpiert: Nieren, Leber, Pankreas, Milz und Lunge.

Bei den Tieren, die 4 bzw. 24 h nach Injektion getötet wurden, wurde der über diesen Zeitraum ausgeschiedene Urin aufgefangen. Die Organe wurden entweder in der Kühltruhe bei -20°C bis zur Aufarbeit eingefroren oder sofort weiterverarbeitet.

Weiterbehandlung des Blutes, der Organe und des Harns:

Das geronnene Blut wurde 15 min bei $6000 \times G$ zentrifugiert. Das Überstehende Serum wurde abpipettiert und zum Enteiweissen im Verhältnis 1 : 1 mit 6 %iger Perchlorsäure versetzt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert (10 min bei $6000 \times G$), die Überstehende Flüssigkeit abgegossen und mit 5 M Kaliumkarbonatlösung neutralisiert. Zur Entfernung des ausgefallenen Kaliumperchlorates wurde nochmals kurz zentrifugiert. In der nunmehr klaren Lösung wurde die Inhibitorkonzentration und -menge mittels des Trypsinhemmtestes bestimmt.

Die Organe wurden nach Zugabe von 1 ml Wasser und 2 ml 6 %iger Perchlorsäure pro g Gewebe unter Kühlung in einem großen Zentrifugenglas homogenisiert (Ultra-Turrax, Typ 18/2, 20 000 U/min, Janke und Kunkel KG). Von der Leber wurde nur ein Teil aufgearbeitet, da wegen ihrer Größe ein Homogenisieren mit dem Ultra-Turrax im Zentrifugenglas unmöglich war. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß sich der Inhibitor völlig gleichmäßig im Lebergewebe verteilt.

Die unlöslichen Gewebsbestandteile wurden abzentrifugiert (15 min bei $1500 \times G$). Der Überstehende Extrakt wurde mit 5 M Kaliumkarbonatlösung neutralisiert. Die Pankreasextrakte wurden vor dem Neutralisieren zur Zerstörung des Trypsinogens für 5 min auf 60°C erhitzt und anschließend wieder abgekühlt. Das ausgefallene Kaliumperchlorat wurde abzentrifugiert. In den nunmehr klaren Lösungen wurde die Inhibitor-konzentration und -menge mittels des Trypsinhemmtestes bestimmt.

Die Bestimmung der Inhibitoraktivität im Harn erfolgte ohne weitere Vorbehandlung, da die Messung der Trypsinhemmung vor und nach Versetzen mit Perchlorsäure die gleiche Inhibitor-konzentration ergab.

3.1.1 Enzyme.

Für die Hemmversuche der Proteasen mit den Inhibitoren wurde Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin verwendet. Trypsin von der Firma Novo-Industrie (Mainz) vom Rind. Als Trypure Novo^R war es dreimal umkristallisiert, salzfrei, ca. 9000 BAEE-E/mg oder 1 BAPNA-E/mg. α -Chymotrypsin von der Firma Worthington stammte vom Rind mit 45 BTEE-E/mg Protein oder 40 Suphepa-mE/mg Protein. Kallikrein aus Schweinepankreas wurde in unserem Labor nach der Methode von FRITZ et al. (1967) hergestellt. 143 BAEE-E/mg Protein. Plasmin von der Firma Novo-Industrie, Mainz, stammte vom Schwein, stabilisiert mit L-Lysin.

3.1.2 Natives Aprotinin und modifizierte Inhibitoren.

3.1.2.1 Aprotinin.

Aprotinin (Trasylol^R), das für unsere Versuche in großer Menge vorhanden sein mußte, wurde uns von der Firma Bayer, Leverkusen, dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Es wurde aus Pankreas u.a. Rinderorganen.... nach den Verfahren von F. SCHULTZ (1959/1962) hergestellt und enthielt 3,4 BAPNA-IU/mg Protein.

3.1.2.2 Polyaminosäurederivate des Aprotinins.

Diese Aprotininderivate wurden durch Reaktion der N-Carboxyaminosäureanhydride von L-Glutaminsäure, L-Alanin und L-Serin mit dem nativen Inhibitor hergestellt.

Darstellung der N-Carboxyanhydride nach GLAZER et al. (1962):
15 g der jeweiligen Aminosäure wurden bei 40°C 15 h über Phosphorpentoxyd im Vakuum getrocknet und in 250 ml wasserfreiem Dioxan gelöst. Dieses wurde vorher 3 h über KOH unter Rückfluß gekocht, destilliert, 5 h unter Rückfluß mit metallischem Natrium gekocht und nochmals destilliert. Dann wurde ein schwacher Strom von H₂SO₄-getrocknetem Phosgen unter magnetischem Rühren bei 40°C 5 h lang in die gesättigte Lösung der Aminosäure eingeleitet.

Der Dreihalskolben, in dem die Reaktion ablief, war mit einem Thermometer und einem Rückflußkühler versehen. Durch letzteren konnten das nicht umgesetzte Phosgen und der entstandene Chlorwasserstoff entweichen. Um ein Eindringen von Feuchtigkeit aus der Luft zu verhindern, war Mg(ClO₄)₂ in das Gasableitungsrohr eingeschaltet worden.

Nach der Umsetzung wurde 14 h lang trockene Luft durch die Reaktionslösung hindurchgesaugt, um das Phosgen und den Chlorwasserstoff zu verdrängen.

Die nichtgelöste Aminosäure wurde unter Feuchtigkeitsausschluß abgenutscht, danach das Dioxan bei 40°C mit Hilfe eines Wasserstrahlpumpenvakuums entfernt. Das zurückbleibende gelbliche Oel (N-Carboxyanhydrid der entsprechenden Aminosäure) wurde sofort mit dem nativen Aprotinin umgesetzt.

Umsetzung von N-Carboxyanhydriden mit dem Kallikrein-Trypsin-Inhibitor und Entsalzung des Produktes:

150 mg nativer Inhibitor und 150 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ wurden in 10 ml 0,0025 M HCl gelöst und mit 10 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,6) versetzt. Unter Rühren und Kühlung (0°C) wurden die aus 15 g L-Aminosäure/N-Carboxyanhydride langsam zu der Inhibitorlösung getropft. Das milchig trübe Produkt wurde 15 h im Kühlschrank gerührt. Danach wurden die wasserunlöslichen Aggregate in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand an Sephadex G-25 (120 x 3,5 cm) mit 0,01 M Essigsäure zum Zwecke der Entsalzung nach der Molekülgröße fraktioniert. Die Absorption des Effluats wurde während der Fraktionierung bei 220 nm mit einem Photometer (Spektralphotometer "LEITZ-UNICAM" SP 820 mit Schreiber) gemessen.

Es traten ein Absorptionsgipfel ohne Inhibitoraktivität und zwei größere Gipfel auf, die beide inhibitorisch wirksam waren. Alle drei Fraktionen wurden getrennt gefriergetrocknet.

Darauf wurden Aprotinin und die Polyamino-säurederivate im Vakuum für 20 h in 6 M HCl bei 105°C hydrolysiert und eine Aminosäureanalyse nach der Methode von SPACKMAN et al. (1958) im Aminosäureanalysator der Firma Beckman (Unichrom-Amino-Acid-Analyzer) unterzogen.

3.1.2.3 Albumin-Aprotinin.

Dieses Derivat wurde durch Kupplung mit Äthandial hergestellt. Nach der Methode von TAKAHASHI (1968) wurden 700 mg Humanalbumin in 30 ml 0,033 M Veronalpuffer (pH 8,0) bei 0°C gelöst, mit 1,1 ml 3 %igem Äthandial versetzt und 3 h unter Kühlung gerührt. Nach Einstellung von pH 10,5 mit 2 M NaOH wurden 5 mg festes Aprotinin zugegeben und 2 h gerührt. Dann wurde die klare Lösung im Rotationsverdampfer auf ca. 12 ml eingeengt, auf Sephadex G-50 (140 x 2,5 cm, mit 0,07 M Collidin-Acetat-Puffer, pH 8,0 äquilibriert) aufgetragen und entsalzt. Anschließend wurde die inhibitorhaltige Fraktion mit dem höchsten Molekulargewicht gefriergetrocknet.

3.1.2.4 Acylderivate des Aprotinins.

Diese Derivate wurden durch Reaktion des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors mit cyclischen Anhydriden von Dicarbonsäuren hergestellt, wie Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Acetylmercaptobernsteinsäureanhydrid und Carboxymethylmercaptobernsteinsäureanhydrid. Das Lysin im reaktiven Zentrum des Inhibitors war dabei durch Komplexbildung mit Trypsin geschützt.

3.1.2.4.1 Acylderivate mit Schutz des Lysin-15 im reaktiven Zentrum.

Bildung des Inhibitor-Trypsin-Komplexes nach CHAUVET und ACHER (1967). Unter Rühren wurden 200 mg Aprotinin und 725 mg Trypsin nach Zugabe von 1 Tropfen Octanol in 50 ml eisgeköhltem 0,1 M Bicarbonatpuffer (pH 8,5) gelöst. Dann wurden solange geringe Mengen an Trypsin oder Inhibitor zugegeben, bis keine überschüssige, enzymatische oder inhibitorische Aktivität mehr nachweisbar war (Trypsintest mit BAPNA, s.u.).

Umsetzung des Trypsin-Inhibitorkomplexes mit den zyklischen Anhydriden nach BUTLER et al. (1967). Die den Komplex enthaltende Lösung wurde unter Kühlung und Rühren mit jeweils 500 mg der oben angeführten Anhydride versetzt. Nach Beendigung der Verseifungsreaktion, nachweisbar an der Konstanz des pH-Wertes, wurde die Zugabe der Reagenzien dreimal wiederholt, so daß insgesamt 3 g Reagenz in vier Portionen zugegeben wurden. Zur Erreichung eines konstanten pH-Wertes von 8 - 9 bei allen Präparaten wurde unter Benützung eines pH-Meters 8 M NaOH zugegeben.

Spaltung der acylierten Inhibitor-Trypsin-Komplexe mit HCl und Fällung des modifizierten Trypsins mit Ammoniumsulfat oder Trichloressigsäure nach FRITZ et al. (1969).

Nach vollständiger Verseifung der zugegebenen Acylierungsmittel wurde Harnstoff bis zur 6 M Endkonzentration hinzugefügt und das Gemisch unter Kühlung und kräftigem Rühren mit konzentrierter HCl bis pH 1,9 angesäuert. Dabei fielen die organischen Säuren und ein geringer Teil des modifizierten Trypsins aus. Letzteres wurde weiterhin durch Zugabe steigender Mengen von 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 und 3 g festem Ammoniumsulfat ausgefällt, wobei die Hemmaktivität des aus dem Trypsinkomplex freigesetzten, acylierten Kallikrein-Trypsin-Inhibitors zunahm, bis bei etwa 2,5 g ein Maximum erreicht wurde (Trypsintest mit BAPNA). Dann wurde der aus den organischen Säuren und Trypsinderivaten bestehende Niederschlag abfiltriert und die Inhibitoraktivität im sauren Filtrat mit dem Trypsintest (BAPNA) bestimmt. Nach Zugabe von 2 ml 0,2 M TRA-Puffer, pH 7,8, wurde mit 8 M NaOH am pH-Meter auf pH 7,8 eingestellt. Im Falle der Umsetzung des Aprotinins mit Carboxymethylmercaptobernsteinsäureanhydrid mißlang die Fällung des Trypsins durch Ammoniumsulfat. Einrühren von fester Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 3 % war aber ohne Verlust an Inhibitor als Fällungsmittel geeignet.

Isolierung und Entsalzung der Inhibitor-derivate:

Das neutralisierte Filtrat, das neben dem partiell acylierten Inhibitor noch kleine Mengen Säure und modifizierten Trypsin-Aprotinin-Komplex enthielt, wurde an Sephadex G-50 fraktioniert (135 x 4,5 cm, mit 0,05 M TRA-Puffer, pH 7,8 und 0,05 M NaCl äquilibriert). Ein Beispiel hierfür ist die Abb. 7, wobei Maleinsäureanhydrid als Acylierungsmittel verwendet wurde. Die den modifizierten Kallikrein-Trypsin-Inhibitor enthaltenden Fraktionen wurden anschließend an Sephadex G-50, äquilibriert mit 0,01 M Essigsäure, entsalzt und gefriergetrocknet.

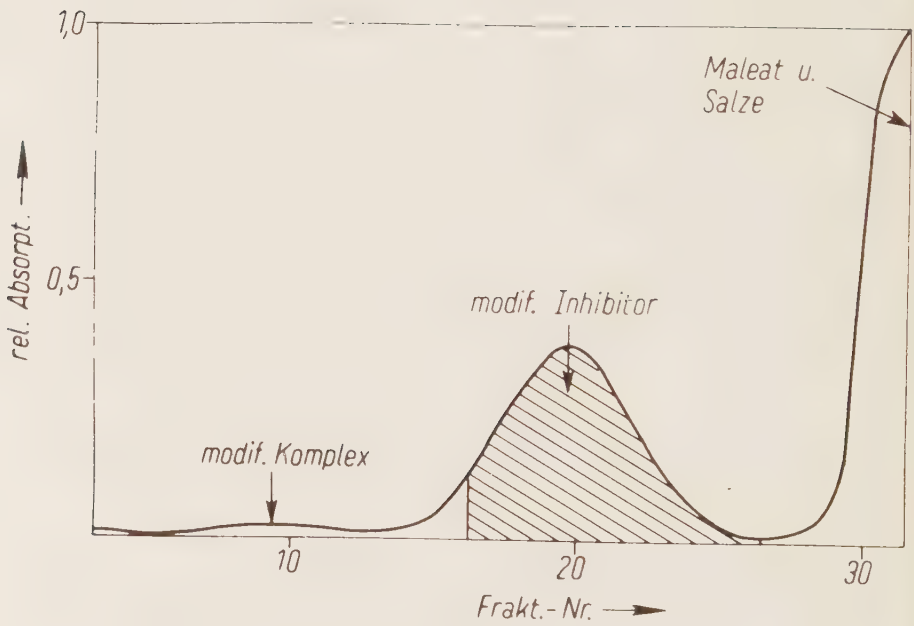


Abb. 7: Trennung des Tetramaleoyl-Inhibitors vom modifizierten Komplex und den Salzen durch Gelfiltration (FRITZ et al., 1969).

3.1.2.4.2 Pentamaleoylderivat des Aprotinins.

Dieses Derivat wurde sehr ähnlich wie die vorausgegangenen Verbindungen hergestellt, nur ohne Schutz des Lysin-15 im Trypsinkomplex.

10 mg Kallikrein-Trypsin-Inhibitor wurden in 10 ml 0,2 M Bikarbonatpuffer, pH 9,0 gelöst und zur Acylierung unter Eiskühlung und intensivem Rühren dreimal mit je 100 mg feingepulvertem Maleinsäureanhydrid versetzt. pH-Kontrolle und -einstellung wie in 3.1.2.4.

Nach der Acylierung wurde nur noch eine Restinhibitoraktivität von etwa 1 % gefunden.

Der pH-Wert der Lösung wurde dann mit HCl auf 7,8 umgestellt und zur Bindung des noch nicht umgesetzten Inhibitors 1 mg Trypsin zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurde die Lösung an Sephadex G-50 (90 x 2 cm, mit 0,5 M TRA-Puffer, pH 7,8 und 0,05 M NaCl äquilibriert) chromatographiert. Die Fraktion mit dem maleoylierten Inhibitor wurde entsalzt und gefriergetrocknet.

3.1.2.5 Derivate des Aprotinins mit Aminogruppenreagenzien (Dansylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat).

Zur Modifizierung des nativen Aprotinins wurden auch zwei der geläufigen Aminogruppenreagenzien verwendet, nämlich 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat. Auch in diesem Falle wurde das reaktive Zentrum des Inhibitors zuvor durch Komplexbildung mit Trypsin geschützt.

3.1.2.5.1 Trypsin-Aprotinin-Komplexbildung und Umsetzung mit Dansylchlorid.

50 mg natives Aprotinin und 190 mg Trypsin wurden unter Kühlung und Rühren in 15 ml 0,1 M Bikarbonatpuffer (pH 8,5) gelöst. Der Lösung wurden solange kleine Mengen Trypsin oder Aprotinin hinzugefügt, bis weder proteolytische noch inhibitorische Aktivität nachzuweisen war. Dann wurden bei Raumtemperatur 50 mg Dansylchlorid in 7,5 ml Aceton zur Lösung hinzugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 18 h gerührt.

Komplexspaltung mit 2 M HCl und Ausfällung des dansylierten Trypsins mit Trichloressigsäure:

Nach Kühlung im Eisbad wurde durch Zugabe von 2 M HCl die Lösung des modifizierten Komplexes auf pH 2 eingestellt. Dann wurde unter kräftigem Rühren 0,7 g Trichloressigsäure zugegeben (Endkonzentration 3 %) und nach 15 min der Niederschlag abfiltriert.

Isolierung und Entsatzung des dansylierten Kallikrein-Trypsin-Inhibitors:

Das Filtrat wurde mit Hilfe einer Sephadex-G-50-Säule (120 x 3,5 cm, mit 0,3 molarer Ameisensäure (pH 2,0) äquilibriert) chromatographiert. Die salzfreien, proteinhaltigen Fraktionen wurden gefriergetrocknet und auf ihre Inhibitoraktivität getestet.

3.1.2.5.2 2,4-Dimethylphenylcyanat-Aprotinin.

Komplexbildung und Umsetzung mit 2,4-Dimethylphenylcyanat:

Komplexbildung wie bei Dansylchlorid, nur 30 ml statt 15 ml 0,1 M Bikarbonatpuffer. Dann wurde 5 ml Dimethylsulfoxid (Endkonzentration 14 %) zugegeben und unter Rühren 4 x je 0,5 ml 2,4-Dimethylphenylcyanat in die Lösung pipettiert. Danach wurde noch 2 h unter Kühlung gerührt.

Komplexspaltung und Fällung des modifizierten Trypsins:

Die Lösung wurde mit Harnstoff (6 M Endkonzentration) versetzt und dann mit konzentrierter HCl auf pH 2 gebracht. Nach Zugabe von 2,5 g Ammoniumsulfat wurde 15 min gerührt und der Niederschlag abfiltriert.

Isolierung und Entsalzung des 2,4-Dimethylphenylcyanataprotinins:

Das Filtrat wurde mit Hilfe einer Sephadex-G-50-Säule (95 x 3 cm mit 0,01 M Essigsäure äquibriert) chromatographiert. Die salzfreien, inhibitorisch aktiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

3.1.2.6 Tetrahomocarginin-Aprotinin (Organ. Synth. 34:67 (1954)).

Durch Umsetzen mit O-Methylisoharnstoff entsteht ein an allen Lysinresten guanidierter Inhibitor (CHAUVEY und ACHER, 1967).

Hierzu wurden nach der eben genannten Methode 6 mg Aprotinin in 0,5 ml 1 M O-Methylisoharnstoff und 0,02 M EDTA gelöst und bei Raumtemperatur für 60 h inkubiert. Zum Abbau des überschüssigen O-Methylisoharnstoffes wurde dann die Lösung mit 0,5 ml 0,5 M NH_4Cl in Wasser versetzt und nach ca. 16 h an Bio-Gel P-2 chromatographiert (75 x 4 cm, äquibriert mit deionisiertem Wasser). Die inhibitorhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und gefriergetrocknet.

3.1.2.7 Selektiv reduziertes Aprotinin (Cys 14/38)
nach KRESS und LASKOWSKI, Sr. (1967 und 1968).

290 mg Aprotinin wurden in der Kälte in 10 ml 0,02 M EDTA gelöst und mit 0,2 M NaOH auf pH 8,5 eingestellt. In das

Reaktionsgefäß wurde zur Verdrängung des Sauerstoffs 5 min lang N_2 eingeleitet. Dann wurde unter leichtem Rühren langsam unter N_2 -Atmosphäre 1 x 11 ml einer frisch bereiteten 0,2 M $NaBH_4$ -Lösung zugetropft. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 ml 0,5 M HCl abgebrochen und das Reaktionsgemisch noch 45 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit das überschüssige $NaBH_4$ abreagieren konnte (N_2 -Schutz). Die so erhaltene Reaktionsmischung wurde sofort weiter für die Substitution der freien Cysteinreste (14/38) verwendet.

3.1.2.8 Derivate von bereits modifiziertem Aprotinin.

Zur Frage einer Struktur-Wirkungs-Beziehung zwischen Veränderung eines Inhibitor-moleküls und proteolytischer Hemmung wurden dann noch inhibitorisch wirksame Derivate des Aprotinins chemisch modifiziert. Dabei wurden vor allem die im reaktiven Zentrum befindlichen Aminosäuren Cys 14 und Lys 15 mit verschiedenen Reagenzien umgesetzt.

3.1.2.8.1 Substitution der freien Cystein-Reste im Aprotinin (Sulphydrylgruppen 14/38).

3.1.2.8.1.1 Umsetzung der freien Sulphydryle mit Jodacetamid:

Das selektiv reduzierte Aprotinin (3.1.2.7) wurde bei 25°C und N_2 -Atmosphäre mit 0,2 M NaOH auf pH 8,2 eingestellt. Dann wurden 10 mg Jodacetamid zugegeben. Nach 30 min wurde mit 1 M HCl angesäuert (pH 2,0) und das Gemisch anschließend auf einer Sephadex-G-50-Säule (32 x 2,6 cm, mit 0,01 M HCl äquilibriert) chromatographiert.

Da der hierbei gewonnene Carbamido-Inhibitor Chymotrypsin nicht mehr hemmt (KRESS et al., 1968), wurde zur Abtrennung des nichtumgesetzten Inhibitors, der Chymotrypsin hemmt, ein stöchiometrischer Komplex mit letzterem, wie oben für Trypsin beschrieben, gebildet. Es wurden dazu bei pH 7,8 und 0°C 10 mg Chymotrypsin zur peptidhaltigen Fraktion von der Säule gegeben und 1 h inkubiert. Dann wurde die Inkubationslösung erneut an Sephadex G-50 (63 x 2 cm, äquilibriert mit 0,05 M TRA-Puffer (pH 7,8)) chromatographiert und der Carbamidoinhibitor vom Chymotrypsin-Inhibitor-Komplex abgetrennt. Die Fraktionen mit dem Carbamido-Inhibitor wurden gesammelt und lyophilisiert.

3.1.2.8.1.2 Umsetzung der freien Sulfhydrylgruppen mit Jodessigsäure:

Das selektiv reduzierte Aprotinin (3.1.2.7) wurde bei 25°C und unter N_2 -Atmosphäre mit 15 mg Jodessigsäure, gelöst in 0,1 ml 1 M NaOH, umgesetzt. Dann wurde entsprechend 3.1.2.7.1.1 verfahren. Die Abtrennung des nichtumgesetzten Inhibitors erfolgte allerdings im stöchiometrischen Trypsin-Komplex, da Trypsin vom umgesetzten Aprotinin nicht mehr gehemmt wird. Es wurden dazu nach Entsalzen 10 mg Trypsin zur inhibitorhaltigen Fraktion gegeben und die Lösung bei 0°C und pH 7,8 für 1 h lang inkubiert. Dann erfolgte die Chromatographie wie unter 3.1.2.7.1.1 beschrieben.

3.1.2.8.1.3 Umsetzung der freien Sulfhydryle mit Äthyle- namin:

2,5 ml der Lösung des spezifisch reduzierten Inhibitors (3.1.2.7) wurden mit 6 ml einer 0,02 igen EDTA-Lösung in Wasser und 1,7 ml einer 3 M TRIS-Lösung versetzt. Mit 2 M HCl wurde der pH-Wert auf 8,7 gebracht und 0,75 ml Äthylenimin unter N_2 -Schutz zugegeben. 30 min danach wurde mit

konzentrierter HCl der pH-Wert auf 2 umgestellt und wie oben beschrieben chromatographiert. Der nichtumgesetzte Inhibitor wurde mit 6 mg Chymotrypsin abgetrennt (vgl. 3.1.2.7.1.2). Dann wurde an Sephadex G-50 (90 x 2,5 cm, äquilibriert mit 0,07 M Collidinacetatpuffer, pH 8,0) entsalzt. Gefriertrocknung wie oben beschrieben.

3.1.2.8.2 Modifizierung des Tetramaleoyl-Aprotinin am Lysin 15.

3.1.2.8.2.1 Darstellung von Tetramaleoyl-(15-homoarginin)-Inhibitor:

Bei dieser Umsetzung wurde der Tetramaleoylinhibitor guanidiert.

In 3,8 ml 1 M O-Methylisoharnstoff und 0,02 M EDTA wurden bei pH 9,5 19 mg Tetramaleoyl-Inhibitor gelöst und bei Raumtemperatur 60 h inkubiert. Dann wurde der überschüssige O-Methylisoharnstoff durch Zugabe von 4 ml 0,5 M NH_4Cl (pH 7,6) während der folgenden 14 h zerstört. Zur Isolierung des modifizierten Inhibitors wurde zunächst an einer Sephadex-G-50-Säule (90 x 4 cm, mit 0,02 M Ammoniumacetat, pH 6 äquilibriert) fraktioniert. Die peptidhaltigen Fraktionen wurden anschließend an BIOGEL P-2, (400 mesh; 75 x 4 cm) entsalzt, wobei als Eluierungsmittel deionisiertes Wasser diente. Dann wurde der Inhibitor gefriergetrocknet.

3.1.2.8.2.2 Darstellung von Tetramaleoyl-(15-N^ε-carbamoyl-lysyl)-Aprotinin.

5 ml deionisiertes Wasser wurden mit 1,5 ml N-Äthylmorpholin gepuffert und mit 500 mg KNCO versetzt. Mit ca. 0,5 ml Eisessig wurde ein pH 8,0 eingestellt. In 0,75 ml dieser

gepufferten Kaliumcyanat-Lösung wurden 10 mg Tetramaleoyl-Kallikrein-Trypsin-Inhibitor gelöst und 56 h bei Raumtemperatur stehengelassen.

Zur Abtrennung der Reagenzien wurde die Reaktionslösung an einer Sephadex-G-50-Säule (70 x 2,6 cm, äquilibriert mit 0,01 M TRIS-Puffer, pH 7,2) fraktioniert. Die peptidhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und am Rotationsverdampfer etwa auf den 10. Teil des Elutionsvolumens eingeeengt. Durch Extinktionsmessung bei 275 nm wurde die Konzentration der Lösung bestimmt. Zum Vergleich wurde eine Tetramaleoyl-Inhibitor-Lösung bekannter Konzentration in 0,01 M TRIS-Puffer (pH 7,2) herangezogen, um das Absorptionsvermögen der Maleoylgruppierung bei 275 nm auszunützen.

3.1.3 Anorganische und organische Reagenzien. Anorganische Substanzen:

NaCl p.a., $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ p.a., NH_4Cl p.a., KOH p.a., NaOH p.a., KH_2PO_4 p.a., KNO_3 p.a., $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a., $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$ p.a., NaBH_4 p.a., $(\text{P}_2\text{O}_5)_2$ p.a., Natrium (MERCK-Darmstadt).

Organische Substanzen:

Äthylalkohol p.a., Aceton p.a., Dioxan p.a., Trichloressigsäure p.a., N-Äthylmorpholin p.a. (MERCK-Darmstadt), Triäthanolamin. Hydrochlorid 99 %, Trishydroxyaminomethan 99 % (BOEHRINGER-Mannheim), Natriumlaurylsulfat reinst (SERVA-Heidelberg), Jodessigsäure p.a., Jodacetamid p.a., O-Methylisoharnstoff p.a. (MERCK-Darmstadt), Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Acetylmercaptobernsteinsäureanhydrid, Carboxymethylmercaptobernsteinsäureanhydrid und 2,4-Dimethylphenylcyanat (BAYER-Lev erkusen), Äthandial p.a. (MERCK-Darmstadt), Äthylenimin puriss. (ROTH-Karlsruhe), 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure p.a., 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfonylchlorid p.a. (SERVA-Heidelberg), Phosgen

(BASF-Ludwigshafen), L-Glutaminsäure, L-Alanin, L-Serin (SERVA-Heidelberg), EDTA p.a. (MERCK-Darmstadt), N-Benzoyl-L-argininäthylester puriss. (FLUKA-Buchs), Nicotinamid-adeninucleotid 92 % (BOEHRINGER-Mannheim), N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid p.a. (MERCK-Darmstadt), N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid 95 % (BOEHRINGER-Mannheim), TRASYLOL^R (BAYER-Leverkusen), Humanalbumin (BEHRINGWERKE-Marburg), Sephadex G-25 und Sephadex G-50 (PHARMACIA-Stockholm) und BIOGEL P-2 (400 mesh) (BIORAD-Los Angeles), 2,3-Butanedion (Eastman Organic Chemicals).

3.2 METHODEN

3.2.1 Enzymteste.

3.2.1.1 Bestimmung der Trypsinhemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970).

Vorbereitung der Lösungen:

Trypsin 6 mg/100 ml 0,0025 M HCl; N- α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) : 1000 mg in 1 l deionisiertem Wasser, in der Wärme lösen; - Triäthanolamin HCl : 18,6 g in 500 ml Wasser mit 735 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ lösen (pH 7,8, 0,2 M). - Aprotinin oder modifizierte Inhibitoren gelöst in 0,2 M TRA-Puffer, pH 7,8.

Inkubation und Durchführung der Messungen:

Die Bestimmungen erfolgten an einem thermostatisierten Photometer "Eppendorf."

In einer Glasküvette (4 ml Gesamtvolumen, 1 cm Schichtdicke) wurden 0,2 ml Trypsinlösung, 0,01-1 ml Inhibitorlösung und 1,79-0,8 ml TRA-Puffer gemischt. Nach 5 min Vorinkubation

bei 25°C wurde durch Zugabe von 1 ml Substratlösung (1 mg BAPNA) die enzymatische Reaktion gestartet. Die Extinktionszunahme, die durch Erhöhung der Konzentration von p-Nitroanilin infolge Freisetzung aus BAPNA zustande kam, wurde nach 15 sec am Photometer bei 405 nm für die Dauer von 5 min alle 60 sec gemessen. Die Differenz der Extinktionszunahme gegenüber einem Ansatz, der keine inhibitorhaltige Lösung enthielt, diente als Maß für die Inhibitorkonzentration der zu testenden Lösung.

Berechnung der Inhibitormenge und -aktivität im Ansatz:

Von 1 mU Trypsin wurden unter Standardbedingungen (25°C; pH 7,8) in 1 min 1 nMol BAPNA umgesetzt. Dies entsprach einer Extinktionszunahme von $\Delta E = 0,00995 / (\text{min} \times \text{ml})$, da der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{molar} von p-Nitroanilin $9,95 \times 10^3 (\text{Mol/l})^{-1}$ betrug. Im 3 ml-Ansatz rief 1 mU Trypsin somit wegen der Verdünnung ein ΔE von 0,00332 hervor.

Die Inhibitoreinheiten wurden ebenfalls in Aktivitäten definiert (FRITZ et al., 1970). 5 mIU Aprotinin hemmten die Aktivität von 10 mU Trypsin zu 50 %. Es wurde jeweils die ID_{50} bestimmt, weil in diesem Bereich die Extinktionsabnahme linear verlief und das Blank-Signalverhältnis für eine präzise Messung günstig war. Aus der Differenz der Extinktionszunahme bei Ansätzen ohne Inhibitor (ΔE_0) und mit Inhibitor (ΔE_I) ergab sich die Extinktionsabnahme durch die Hemmung (ΔE_H).

$$(1) \quad \Delta E_0 - \Delta E_I = \Delta E_H$$

Daraus ließ sich die Gesamtmenge an Inhibitor zur Ausbeutebestimmung bzw. auch bei bekannter Gesamtmenge die Inhibitoraktivität bestimmen. Für erstere gilt Formel (2).

$$(2) \quad \frac{(\Delta E_O - \Delta E_H) \times V_G}{\epsilon \times V_A \times t} = \text{inhibitorische Gesamtaktivität}$$

V_G = Gesamtvolumen des Inhibitorpräparates

V_A = Volumen des Ansatzes.

3.2.1.2 Bestimmung der Chymotrypsin-Hemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970).

Vorbereitung der Lösungen:

Chymotrypsin, 10 mg in 50 ml 0,0025 M HCl-Substrat: N-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid, Suphepa: 50 mg in 10 ml 0,2 M TRA-Puffer pH 7,8 - Triäthanolamin. HCl, 18,6 g in 500 ml H₂O, mit 2 M NaOH auf pH 7,8 eingestellt.

Inkubation und Durchführung der Messungen:

In einer Glasküvette (4 ml, 1 cm Schichtdicke) wurden 0,1 ml Chymotrypsinlösung, 0,01 - 1 ml Inhibitorlösung und 1,89 - 0,9 ml Puffer inkubiert. Nach 5 min Vorinkubation bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Substratlösung (5 mg) gestartet. Die Zunahme der Extinktion durch Freisetzung von p-Nitroanilin wurde nach 15 sec und nach weiteren 30 min bei 405 nm gemessen.

Die Ansätze ohne Inhibitor hatten ein ΔE um 0,08/30 min. Bestimmung der Hemmung s. 3.2.1.2.

Berechnung der Inhibitormenge und -aktivität:

Da das Substrat N-(3-Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid bei der Umsetzung mit Chymotrypsin auch p-Nitroanilin freisetzte, war die Berechnung analog der bei Trypsin. Es war nur zu berücksichtigen, daß die Extinktionszunahme nicht nach 1 min, sondern nach 30 min gemessen wurde, so daß der ermittelte Wert durch 30 dividiert werden mußte.

3.2.1.3 Bestimmung der Kallikrein-Hemmung durch Aprotinin nach FRITZ et al. (1970):

Vorbereitung der Lösungen:

Kallikrein 0,8 mg/100 ml 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,9 - N α -Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE), davon 26 mg in 25 ml des unten stehenden Puffers - 1,17 g NaCl, 0,7 mg EDTA und 2,48 g Triäthanolamin.Hydrochlorid in 200 ml H₂O mit 2 M NaOH auf pH 8,0 bringen.

Die Bestimmungen erfolgten an einem thermostatisierten UV-Spektrographen "LEITZ UNICAM S P 820."

Inkubation und Durchführung der Messungen:

In einer Quarzküvette (4 ml, 1 cm Schichtdicke) wurden 0,05 ml Kallikreidlösung, 0,02 - 0,2 ml Inhibitorlösung (s. vorherige Abschnitte) und 2,4 - 2,25 ml natriumchlorid- und EDTA-haltigem TRA-Puffer (pH 8,0) inkubiert. Der Testansatz wurde 10 min bei 25°C vorinkubiert und durch Zugabe von 0,5 ml BAEE-Lösung die Reaktion gestartet. Die Zunahme der Extinktion, die durch Freisetzung von Benzoylarginin aus dem Äthylester (BAEE) hervorgerufen wurde, wurde bei 253 nm für einige min in Minutenabständen gemessen. Weitere Angaben s. vorherige Abschnitte.

Berechnung der Inhibitormenge und -aktivität:

Die Auswertung erfolgte mit einem "SERVOGOR"-Schreiber auf graphischem Wege. Der Schreiber des "LEITZ-UNICAM S P 820"-Spektralphotometers lieferte in kontinuierlichen Zeitabständen Extinktionswerte, deren Steigung im linearen Anfangsteil gegenüber der Nulllinie (Abszisse) gemessen wurde. Der Tangens dieses Winkels diente uns als Maß für die Extinktionsänderung. Die Berechnung erfolgte dann wie bei den übrigen Enzymen. Danach entspricht 1 Kallikrein-Inhibitor-Einheit (KIE) 0,56 mIU Trypsininhibitoreinheiten (BAPNA/Trypsin) und hemmt zwei Kallikrein-Einheiten (KE) zu 50 %.

3.2.1.4 Bestimmung der Plasmin-Hemmung nach FRITZ et al. (1970).

Vorbereitung der Lösungen:

Plasmin, 250 mg/2 ml 0,0025 M HCl - N α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid, 100 mg in 100 ml deionisiertem Wasser lösen - TRA-Puffer, 3,61 g Triäthanolamin.hydrochlorid in 100 ml deionisiertem Wasser lösen, mit 913,5 mg Lysin.hydrochlorid versetzen, pH 7,8 mit 2 M NaOH einstellen.

Die Messungen erfolgten an einem thermostatisierten Photometer "Eppendorf" bei 405 nm.

Inkubation und Durchführung der Messungen:

In einer Glasküvette (4 ml, 1 cm Schichtdicke) wurden 0,2 ml Plasminlösung, 1,79 - 1,7 ml Puffer und 0,01 - 0,1 ml der Inhibitorlösung inkubiert. Nach 5 min Vorinkubation bei 25°C wurde durch Zugabe von 1 ml Substratlösung die Reaktion gestartet. Die Extinktionszunahme, die durch die Frei-

setzung von p-Nitroanilin aus BApNA zustande kam, wurde bei 405 nm nach 15 sec und nach 20 min gemessen. Die Differenz der Extinktionszunahme zwischen einem Ansatz ohne und einem mit inhibitorhaltiger Lösung diente als Maß für die Inhibitorkonzentration der zu testenden Lösung. Die Berechnung erfolgte analog der bei der Hemmung des Trypsins. Dabei war aber zu berücksichtigen, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Spaltung von BApNA durch Plasmin geringer war als beim Trypsin, so daß die Extinktionsänderung erst nach 20 min gemessen wurde. Sie lag bei etwa 0,28/20 min.

3.2.1.5 Bestimmung des Inhibitorgehaltes von Geweben, Serum und Harn.

Die Aufbereitung der Organe und Sekrete erfolgte wie unter 3.1 beschrieben. Anschließend wurde mit den enteiweißten und neutralisierten Extrakten die Bestimmung der Hemmaktivität gegenüber Trypsin, wie unter 3.2.1.1 beschrieben, durchgeführt.

3.2.2 Aminogruppenbestimmung im Aprotinin und seinen Derivaten.

Die freien und umgesetzten Aminogruppen im Aprotinin wurden durch Reaktion mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure, 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfochlorid und durch Messen der UV-Absorption bei 250 nm bestimmt.

3.2.2.1 Bestimmung der freien Aminogruppen in Aprotinin-
derivaten mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure,
nach HAYNES et al. (1967).

1 mg Inhibitor wurde in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 1 ml 0,5 M Bicarbonat (pH 8,0) gepuffert. Dann wurden die Proben mit 1 ml einer frisch bereiteten 0,003 M 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäurelösung (in Wasser) 2 h bei 35°C inkubiert. Vor dem Abbruch der Reaktion, die mit 0,5 ml 1 M HCl erfolgte, wurde 1 ml einer 0,35 M Natriumlaurylsulfatlösung zugegeben, um die Peptide beim Ansäuern in Lösung zu halten und eine Trübung zu vermeiden. Dann wurde die Absorption des Ansatzes bei 344 nm gegen eine inhibitorfreie Vergleichslösung gemessen (Leerwert). Die Abnahme der Extinktion entsprach dem Ausmaß der Umsetzung der freien Aminogruppen mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure.

3.2.2.2 Bestimmung der freien Aminogruppen in den Inhibi-
toren durch Dansylierung nach GRAY (1967).

1 mg Inhibitor wurde in 1,4 ml deionisiertem Wasser gelöst und mit 1,6 ml 0,1 M Bicarbonatpuffer (pH 8,0) versetzt. Dann wurde 1 ml Aceton zugegeben. Danach wurden 4 mg Dansylchlorid in 0,5 ml Aceton zugegeben. Die Reaktion, die im Dunkeln bei Raumtemperatur ablief, wurde nach 18 h durch Einengen zur Trockne am Rotationsverdampfer abgebrochen.

Zur Entfernung des überschüssigen Dansylchlorids wurde der Ansatz mehrmals mit absolutem Alkohol gewaschen. Dann wurde er in einer mehrmals unter N₂ evakuierten Ampulle zusammen mit 5 ml 6 N HCl bei 105°C für die Dauer von 20 h hydroly-

siert. Durch dreimaliges Einengen zur Trockne mit entionisiertem Wasser wurde die Salzsäure größtenteils entfernt. Danach wurden die Aminosäuren am Beckman-Unichrom-Aminosäure-Analysator bestimmt und so die Lysinreste erkannt, die infolge Acylierung oder Komplexbildung nicht dansyliert werden konnten.

3.2.2.3 Bestimmung der maleoylierten Aminogruppen durch UV-Absorptionsmessungen bei 250 nm nach BUTLER et al. (1969).

5 mg nativer und 5 mg maleoylierter Inhibitor wurden in je 50 ml 0,1 M NaOH gelöst, so daß eine Konzentration von 0,1 mg Protein pro ml Lösung resultierte. Von den beiden Lösungen wurde die Absorption bei 250 nm gemessen, wobei der optische Weg 1 cm betrug.

3.2.3 Elektrophorese mit den Inhibitoren.

Die Elektrophoresen wurden mit einer Apparatur von der Fa. Hobein und Bender (München-Karlsruhe-Zürich), konstruiert von W. Grassmann und K. Hannig, vorgenommen. 0,3 mg jedes Inhibitorderivates wurde in 0,05 M Boratpuffer gelöst und auf die mit 0,05 M Boratpuffer (pH 8,0) getränkte Celluloseacetfolie (Fa. Schleicher und Schüll aus Dassel/Kr. Einbeck) aufgetragen. Bei einer Laufzeit von 1 h betrug das angelegte Potential 6 Volt/cm bei einem Elektrodenabstand von 33 cm. Danach wurden die Folien mit einem Föhn getrocknet und mit einer gesättigten Lösung von Amidoschwarz

(Naphtholblauschwarz B in 90 % Methanol und 10 % Eisessig) ca. 15 min lang angefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend mit demselben Lösungsmittel herausgewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Zonen mit Kugelschreiber markiert und ihr Abstand von der Startlinie, die vor Beginn der Elektrophorese mit Bleistift vorsichtig markiert worden war, ausgemessen.

3.2.4 Aminosäureanalysen.

Ca. 1 mg gefriergetrocknete Substanz wurde in 5 ml dreifach dest. 6 M HCl unter Wasserstrahlpumpenvakuum eingeschmolzen und 20 h bei 110°C hydrolysiert. Zur Entfernung der HCl wurde das Hydrolysat danach bis zur Trockne eingeeengt. Dieser Prozeß wurde 2 mal wiederholt. Danach wurde die Substanz mit einem Spezialpuffer aufgenommen und auf die Säulen des "Beckman-Unichrom-Aminosäure-Analysators" aufgetragen.

4. ERGEBNISSE

4.1 EIGENSCHAFTEN DES APROTININS UND DER MODIFIZIERTEN INHIBITOREN

4.1.1 Chemische Konstitution von Aprotinin und den modifizierten Inhibitoren.

Aprotinin und die modifizierten Inhibitoren weisen in vieler Hinsicht verschiedene chemische und biochemische Eigenschaften auf. Sie werden deshalb auch einzeln abgehandelt, und zwar in der Reihenfolge, wie sie bei der Darstellung angewandt wurde (s.o.).

4.1.1.1 Natives Aprotinin und die Polyaminosäurederivate des Aprotinins.

Die Aminosäureanalysen (Abb. 8) ergaben, daß sich in zwei Ansätzen mit Glutaminsäureanhydrid nur ein Aminosäurerest mit freien Aminogruppen peptidartig verbunden hatte (5 : 3 im nativen Inhibitor, 5 : 4 im modifizierten), aber 2 Serinreste und 3 Alaninreste. Dadurch vergrößerte sich nicht nur das Molekulargewicht, sondern auch die positive Ladung des Aprotinins ging teilweise verloren. Dies ließ sich auch durch die Wanderung der Peptide bei der Elektrophorese nachweisen.

Inhibitor	Relativer Gehalt an Aminosäuren			
	Asp	Glu	Ser	Ala
nativer Inhibitor	1,0	0,628	0,246	1,160
Glu-Inhibitor I	1,0	0,772	-	-
Glu-Inhibitor II	1,0	0,763	-	-
Poly-Ser-Inhibitor	1,0	-	0,568	-
Poly-Ala-Inhibitor	1,0	-	-	1,870

Abb 8: Verhältnis einiger Aminosäuren von Aprotinin und den Polyamino-säurederivaten des Aprotinins.
 Der Asparaginsäuregehalt (5 Aminosäurereste) wurde gleich 1 gesetzt. Die übrigen Aminosäuren traten in dem von VOGEL et al. (1966) beschriebenen Verhältnis auf, werden aber hier nicht alle angezeigt.

Auf Acetatfolie mit 0,01 M Veronalpuffer (pH 9,0) bei 12 V/cm für 1 h wanderte das native Aprotinin bis zum äußeren Ende der Folie in Richtung zur Kathode. Unterwarf man aber die einzelnen Fraktionen des mit N-Carboxyanhydrid von L-Glutaminsäure umgesetzten Aprotinins denselben Elektrophoresebedingungen, so fand man einzelne Zonen, die zwischen Start und Peptidbande des nativen Aprotinins lagen. Ja, es wurden sogar Zonen gefunden, die anodisch gewandert waren. Wahrscheinlich war das Produkt, das dann jeweils anders in der Elektrophorese gewandert war, an einem anderen Aminorest substituiert worden.

4.1.1.2 Albumin-Aprotinin.

Die Hemmaktivität von Albumin-Aprotinin wurde sowohl gegenüber Trypsin (Substrat: BAPNA) als auch gegenüber Kallikrein (Substrat: BAEE/ADH/NAD) bestimmt. Es wurde ein Hemmverhältnis von 1:48 bei 9900 Trypsin-ImU und 475000 Kallikrein-ImU gefunden. Damit war die Affinität des Albumin-Aprotinins zum Kallikrein aus vermutlich sterischen Gründen im Vergleich zum nativen Inhibitor (1:123) auf 40 % abgefallen (vgl. Abb. 14).

4.1.1.3 Acylderivate des Aprotinins.

Bei der Umsetzung des Aprotinins mit verschiedenen Acylierungsmitteln war mindestens eine ϵ -Aminogruppe der vier Lysinreste bei den Umsetzungen im Trypsin-Komplex der Acylierung nicht zugänglich. Dies zeigten alle drei Bestimmungsmethoden der Zahl der freien Aminogruppen, nämlich (1) die Reaktion des modifizierten Inhibitors mit 2,4,6-

Trinitrobenzolsulfonsäure und Messen der Absorption bei 344 nm, (2) Reaktion mit 1-Dimethylaminonaphthalin-5-sulfochlorid (Dansylierung) und anschließende Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Reaktionsprodukte und (3) Bestimmung der Zahl der maleoylierten Aminogruppen durch Messen der UV-Absorption bei 250 nm.

Die Umsetzung der verschiedenen Modifikationen des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure lieferte die in Abb. 9 dargestellten Werte. Danach entsprach eine Extinktion von 1,05 den fünf freien Aminogruppen des nativen Inhibitors. Die Reaktionsprodukte der Umsetzung des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors mit cyclischen Anhydriden zeigten aber nur durchschnittlich eine freie Aminogruppe (Abb. 9).

Inhibitor	Absorption bei 344 nm	Freie Aminogruppen/ Inhibitormolekül
Nativer Inhibitor	1,05	5
Maleoylierter Inhibitor	0,26	1,24
Succinylierter Inhibitor	0,22	1,05
Acetylmercaptosuccinylierter Inhibitor	0,22	1,05
Carboxymethylmercaptosuccinylierter Inhibitor	0,19	0,91

Abb. 9: Zahl der freien Aminogruppen in den Acylderivaten des Aprotinins.
Bestimmung der Aminogruppen bei 344 nm nach Umsetzung mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure.

Dieser Befund wurde durch Dansylierung der Acylderivate bestätigt. Die Bestimmung der unveränderten Lysinreste mit dem Aminosäurenanalysator lieferte dabei Werte für den Tetramaleoyl-Inhibitor im Vergleich mit dem nativen Inhibitor, die in Abb. 10 zusammengefaßt wurden. Danach war ein Lysylrest (0,86) nicht acyliert worden, so daß er dansyliert werden konnte und nicht mehr im Lysinpeak erschien.

Aminosäure	<u>Zahl der Aminosäurereste:</u>		Differenz
	im nativen Inhibitor	im modifizierten Inhibitor	
Lysin	3,96	3,10	0,86
Glutaminsäure	3,07	3,03	0,04
Glycin	6,08	6,03	0,05

Abb. 10: Aminosäureanalyse des dansylierten, im Trypsinkom-
plex maleoylierten Inhibitors.
Ein Lysinrest konnte dansyliert werden. Bedingungen
des Versuches s. Material und Methodik.

Auch die UV-Absorptionsmessungen bei 250 nm lieferten Werte, die mit den Ergebnissen der beiden anderen Aminogruppen-Bestimmungen übereinstimmten. Die Extinktionen betrugen bei einer Konzentration von 0,1 mg Aprotinin/ml 0,1 M NaOH für den im Trypsinkomplex maleoylierten Inhibitor 0,86, für den nativen Inhibitor 0,66. Die Differenz von 0,20 entsprach bei der Umrechnung der gemessenen Extinktionsdifferenz auf 1 mMol modifizierter Inhibitor (= 6837 mg Tetratmaleoyl-Aprotinin) ein ΔE_{250} von 13 674. Dividierte man diesen Wert durch den relativen Extinktionskoeffizienten für eine Maleoyl-Aminogruppe von $\epsilon_{250} = 3360$, so resultierten daraus 4,07 Maleoyl-Reste/Inhibitmolekül. Somit war von 5 Aminogruppen eine nicht mit Maleinsäureanhydrid umgesetzt worden.

Bei der Elektrophorese der Acylderivate des Aprotinins wanderte der native Inhibitor zur Kathode. Der maleoylierte Inhibitor, der succinylierte und der acetylmerdaptosuccinylierte blieben am Startpunkt liegen; der carboxymethylsuccinylierte Inhibitor wanderte geringfügig zur Anode. Dies war zu erwarten, wenn durch die Umsetzung der freien Aminogruppen das Molekül seine Protonierung verlor und durch die Einführung der Carboxymethylgruppe sogar eine geringfügige negative Ladung erhielt.

Die Umsetzung des nicht im Trypsinkomplex teilweise geschützten Inhibitors mit Maleinsäureanhydrid ergab das Pentamaleoylderivat des Aprotinins. Das Produkt der Reaktion wurde in unseren Untersuchungen nicht chemisch analysiert, sondern nur seine Unwirksamkeit im Test mit Trypsin festgestellt.

4.1.1.4 Derivate des Aprotinins mit Dansylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat.

Die Bestimmung der freien Aminogruppen in den beiden modifizierten Aprotininen erfolgte wie bei den Acylderivaten nach Umsetzung mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (Abb. 11) nach HABEED (1966). Beim dansylierten Inhibitor, dessen Reaktion mit Dansyl-

chlorid im Komplex mit Trypsin verlief, so daß mindestens eine Aminogruppe unbesetzt bleiben mußte, hatte unerwarteterweise eine zweite Aminogruppe nicht reagiert. Das hatte vermutlich sterische Gründe. Das Dansylmolekül ist verhältnismäßig sperrig und vermag deshalb in Gegenwart des Trypsins - d.h. im Komplex mit Trypsin - wahrscheinlich die ϵ -Aminogruppe eines weiteren Lysinrestes (vermutlich Lysin 41) nicht zu erreichen. Dasselbe Ergebnis, nämlich 2 freie Aminogruppen, erhielten wir auch beim Dimethylphenylcyanat-Inhibitor (Abb. 11).

Bei der Elektrophorese auf Acetatfolie wanderten sowohl der dansylierte als auch der Dimethylphenylcyanat-Inhibitor zur Kathode, was auf Grund der 2 freien, bei pH 8,0 protoniert vorliegenden Aminogruppen auch zu erwarten war.

Inhibitor	Absorption bei 344 nm	Freie Aminogruppen/ Inhibitormolekül
Nativer Inhibitor	1,05	5
Dansylierter Inhibitor	0,42	2,01
Dimethylphenylcyanat- Inhibitor	0,44	2,10

Abb. 11: Zahl der freien Aminogruppen in den Acylderivaten
des Aprotinins.
Bestimmung der Aminogruppen bei 344 nm nach Umse-
tzung mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure.

4.1.2 Modellvorstellungen über Aprotinin und die modifizierten Inhibitoren sowie Formulierung der Reaktionen.

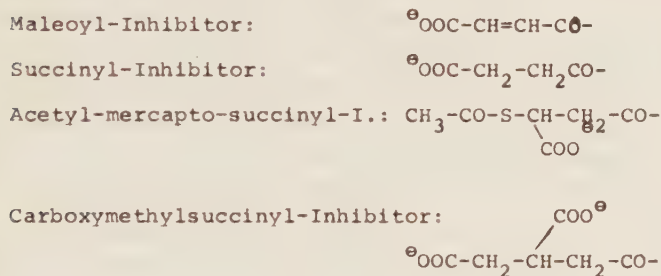
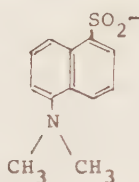


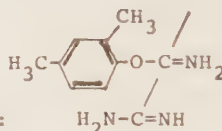
Abb. 12: Derivate des Aprotinins:

In ihnen wurden die α -NH₂-Gruppe des N-terminalen Argininrestes und die ϵ -Aminogruppen der Lysin-Reste in Stellung 26, 41 und 46 mit Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid, Acetylmercaptobernsteinsäureanhydrid und Carboxymethylbernsteinsäureanhydrid acyliert.

Dansyl-Inhibitor:



Dimethylphenylcyanat-Inhibitor:



^{a)}
N¹⁵-guanidierter Maleoyl-Inhibitor:



^{b)}
N¹⁵-carbamoylierter Maleoyl-Inhibitor:

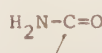


Abb. 13: Derivate des Aprotinins.

Die freien Aminogruppen (s. Abb. 12) wurden mit Dansylchlorid und Dimethylphenylcyanat umgesetzt, bzw. zusätzlich durch Substitution der genannten Aminogruppen durch Maleinsäureanhydrid die ε-Aminogruppe des Lysin-Restes in Stellung 15 mit O-Methylisoharnstoff oder Kaliumcyanat modifiziert. Dies entsprach einem "Austausch" des Lysin-15-Restes durch einen Homoargininrest oder Homocitrullinrest.

a)

b)

4.1.3 Hemmung der proteolytischen Enzyme durch natives Aprotinin und seine Derivate.

4.1.3.1 Hemmung der proteolytischen Enzyme durch Aprotinin und die Polyaminosäurederivate.

Die Hemmung der Enzyme: Chymotrypsin (Substrat: Suphepa), Trypsin (Substrat: BApNA) und Kallikrein (Substrat: BAEE/ADH/NAD) durch den nativen Inhibitor Aprotinin und seine Polyaminosäurederivate wurde bestimmt; dabei wurden die Hemmverhältnisse (Relativzahlen, bezogen auf verschiedene Substrate) auf 1 mIU Chymotrypsin (Suphepa) bezogen (Abb.14). Die Zahlen zeigen, daß die Hemmaktivität gegenüber Kallikrein nicht abgenommen hatte, wie das bei den Acylierungsderivaten der Fall gewesen war. Die Hemmwirkung war auf molarer Basis zwischen nativem Aprotinin und seinen Polyaminosäurederivaten gleich geblieben.

Damit eigneten sich diese Inhibitorderivate in besonderem Maße für Versuche über die Pharmakokinetik und über eine verlängerte Wirksamkeit im Organismus.

Inhibitor	Relative Hemmwirkung gegenüber Proteasen		
	Trypsin	Chymotrypsin	Kallikrein

Natives Aprotinin	41,5	:	1	:	5110
Poly-Glu-Inhibitor	46,7	:	1	:	5230
Poly-Ser-Inhibitor	46,0	:	1	:	5700
Poly-Ala-Inhibitor	46,7	:	1	:	5110

Abb. 14: Hemmverhältnisse bei dem nativen Aprotinin und den Poly-Aminosäurederivaten des Aprotinins.

Substrat für Trypsin war BAPNA, für Chymotrypsin Su - phepa, für Kallikrein BAEE. Bestimmung der Hemmwirkung s. Methodik. Die Hemmwirkung gegenüber Chymotrypsin (50 %) wurde gleich 1 gesetzt.

4.1.3.2 Hemmung von Trypsin und Kallikrein durch Aprotinin und Albumin-Aprotinin.

Die Hemmaktivität von Albumin-Aprotinin wurde sowohl gegenüber Trypsin (Substrat: BApNA) als auch gegenüber Kallikrein (Substrat: BAEE/ADH/NAD) bestimmt. Es wurde ein Hemmverhältnis von 1 : 48 gefunden. Damit war die Kallikreinaktivität aus vermutlich sterischen Gründen im Vergleich zum nativen Aprotinin um 60 % abgefallen. Beim Aprotinin beträgt das Hemmverhältnis 1 : 123.

4.1.3.3 Acylderivate des Aprotinins.

Die meisten Untersuchungen über die Hemmwirkung von modifizierten Inhibitoren gegenüber verschiedenen Proteasen wurden mit den Acylderivaten des Aprotinins durchgeführt.

4.1.3.3.1 Vergleich der Hemmaktivität der Inhibitoren gegenüber verschiedenen Proteasen.

Durch die Acylierung wird keiner der Inhibitoren aktiver als das native Aprotinin, sondern alle verlieren mehr oder weniger an Aktivität (Abb. 15), wobei als Enzym hierbei zunächst Trypsin zu betrachten ist. Der geringste Verlust ist beim maleoylierten Inhibitor zu beobachten. Mit nur 11 % darf er als praktisch ebenso aktiv wie das native Aprotinin gelten. Die geringste relative Aktivität findet sich beim succinylierten Inhibitor, der 35 % seiner Aktivität verloren hat.

Entsprechend dem Abfall der spezifischen Aktivität bei den einzelnen Derivaten mußte beim Vergleich der Hemmwirkung der modifizierten Aprotinine auf verschiedene proteolytische Enzyme unterschiedliche, in jedem Fall aber größere Substanzmengen eingesetzt werden, die den jeweils gleichen Inhibitoraktivitäten in ImU für Trypsin entsprachen. Damit wurde nun die Hemmaktivität der Acylcerivate des Aprotinins gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin untersucht (Abb. 15).

Bei den Hemmkurven mit Trypsin fiel auf (Abb. 16 a), daß bei Einsatz äquieffektiver Inhibitormengen (=gleiche Inhibitoraktivitäten) diese Kurven praktisch für alle Inhibitoren gleich waren. Nur im Bereich zwischen 90 und 100 % Hemmung erwies sich der acetylmercaptosuccinylierte Inhibitor als geringfügig schwächer als die anderen eingesetzten Derivate.

Inhibitor	Spezifische Aktivität ImU/nMol	Relative Aktivität (%)
Nativer Inhibitor	24,435	100
Maleoylierter Inhibitor	21,923	89
Succinylierter Inhibitor	15,900	65
Acetylmercaptosuccinylierter Inhibitor	20,052	82
Carboxymethylsuccinylierter Inhibitor	16,649	68

Abb. 15: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Aprotinin und seinen acylierten Derivaten gegenüber Trypsin.

Bestimmung der Hemmung mit dem BAPNA-Test (vgl. Methodik). Bei relativer Aktivität ist Aprotinin gleich 100 %. Der Vergleich wurde bei 50 %iger Hemmung durchgeführt.

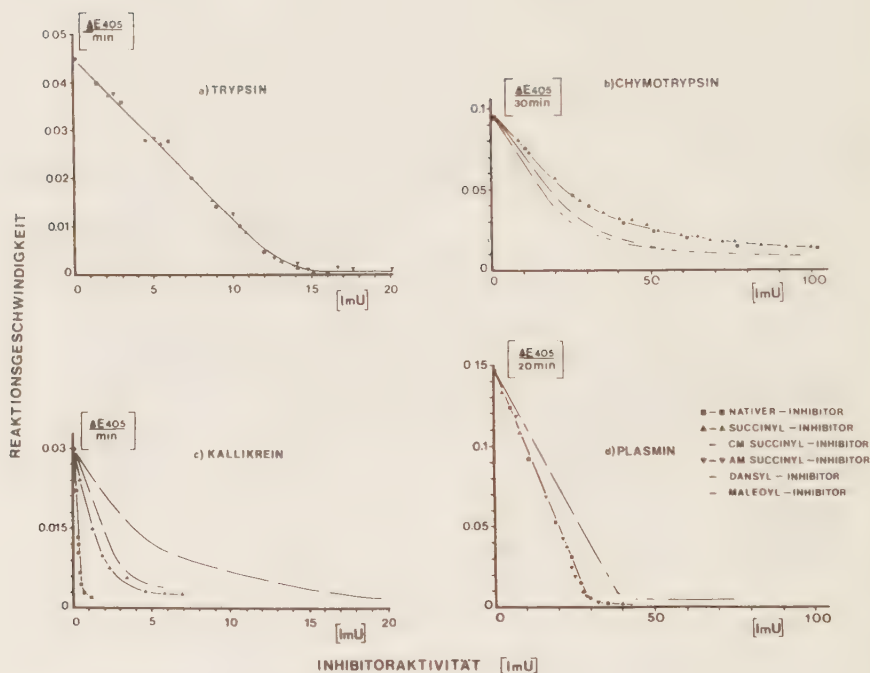


Abb. 16: Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin und Kallikrein durch Aprotinin und seine Derivate.

Inhibitionsbedingungen für die einzelnen Enzyme s. Methodik. Die Ermittlung der entsprechenden Inhibitoraktivitäten (Abszisse) wurde aus Abb. 15 durch die entsprechenden spezifischen Aktivitäten gegenüber Trypsin erhalten. Die Enzymaktivitäten im Ansatz waren 10 ug (10 mU) Trypsin, 20 ug (1 mU) Chymotrypsin, 420 ug (60 mU) Kallikrein und 100 ug (50 mU) Plasmin.

Bei den Hemmkurven mit Chymotrypsin (Abb. 16 b) wurden von denen mit Trypsin abweichende Resultate erhalten. Diese Unterschiede wurden weiter unten noch durch die mit Kallikrein in größerem Maße verdeutlicht. Sie zeigten, daß durch Modifizierung des Aprotinins Substanzen erhalten werden, die auf die proteolytischen Enzyme in differenter Weise einwirken. Dieser Effekt war aus der stöchiometrischen Reaktion zwischen beiden Reaktionspartnern (1 Mol pro 1 Mol) nicht zu erwarten und benötigte deshalb die in der Diskussion beschriebenen Überlegungen. Die Hemmkurven für das native Aprotinin verliefen gleichartig, während der carboxymethylsuccinylierte Inhibitor eine relativ stärkere Hemmung zeigte. Dies ließ sich nur so interpretieren, daß offensichtlich bei diesem Derivat die Hemmung von Chymotrypsin weniger beeinflußt wurde als die von Trypsin.

Bei den Hemmkurven mit Kallikrein (Abb. 16 c) zeigte es sich, daß die Aktivität gegenüber diesem Enzym durch Modifizierung der Inhibitoren am stärksten beeinträchtigt wurde. Die Abnahme der Aktivität übertraf die gegenüber Trypsin erheblich und war am ausgeprägtesten beim carboxymethylsuccinylierten Aprotinin. Da mit nativem Inhibitor eine 50 %ige Hemmung des Kallikreins bereits mit 0,4 ImU erreicht wurde, dagegen beim carboxymethylsuccinylierten Präparat erst mit etwa 4 ImU, wurde durch die Modifizierung des Aprotinins die Hemmung des Kallikreins 10 mal mehr reduziert als die des Trypsins. Im Falle des maleoylierten Inhibitors ist dieser Effekt vor allem deshalb hervorzuheben, weil ja diese Modifizierung des Aprotinins praktisch keinen Einfluß auf die spezifische Hemmaktivität gegenüber Trypsin hervorgerufen hatte.

Bei den Hemmkurven mit Plasmin (Abb. 16 d) waren die Unterschiede zwischen Trypsinhemmung und Plasminhemmung zwar

vorhanden, aber wiederum wenig ausgeprägt. Am stärksten verlor der carboxymethylsuccinylierte Inhibitor an Aktivität, während der acetylmercaptosuccinylierte Inhibitor gegenüber der Wirkung auf Trypsin sich beim Plasmin nicht veränderte.

4.1.3.3.2 Vergleich der Komplexbildungsgeschwindigkeit zwischen proteolytischen Enzymen und Inhibitoren zur Erreichung der zeitlich optimalen Hemmung.

Zur Erreichung der optimalen Hemmung der proteolytischen Enzyme durch die Inhibitoren waren unterschiedliche Vorinkubationszeiten notwendig, die vom Hemmgrad abhingen (Abb. 17, 18). Bei 70 %iger Hemmung von Trypsin (Abb. 17a) benötigte Aprotinin 10 min Vorinkubationszeit, der maleoylierte Inhibitor dagegen nur 20 sec, während die übrigen Inhibitoren unter 5 min lagen. Danach benötigte also der native Inhibitor zur Komplexbildung mit Trypsin längere Zeit als die modifizierten Aprotinine. Dasselbe wurde bei 90 %iger Hemmung beobachtet (Abb. 18 a), nur trat die optimale Hemmung erst nach längerer Vorinkubationszeit ein als bei 70 %iger.

Bei Chymotrypsin (Abb. 17 b, 18 b) wurden dieselben Beobachtungen gemacht wie beim Trypsin. Beim Kallikrein allerdings stellte sich eine Ausnahme ein: zur optimalen Hemmung bei 90 % wurden längere Vorinkubationszeiten benötigt als bei 70 % (Abb. 17 c, 18 c). Beim Plasmin war bei 70 %iger Hemmung die Hemmendzeit ebenfalls bei den modifizierten Inhibitoren länger als beim nativen Aprotinin (Abb. 17 d). Bei 90 %iger Hemmung war dieser Unterschied allerdings aufgehoben (Abb. 18 d).

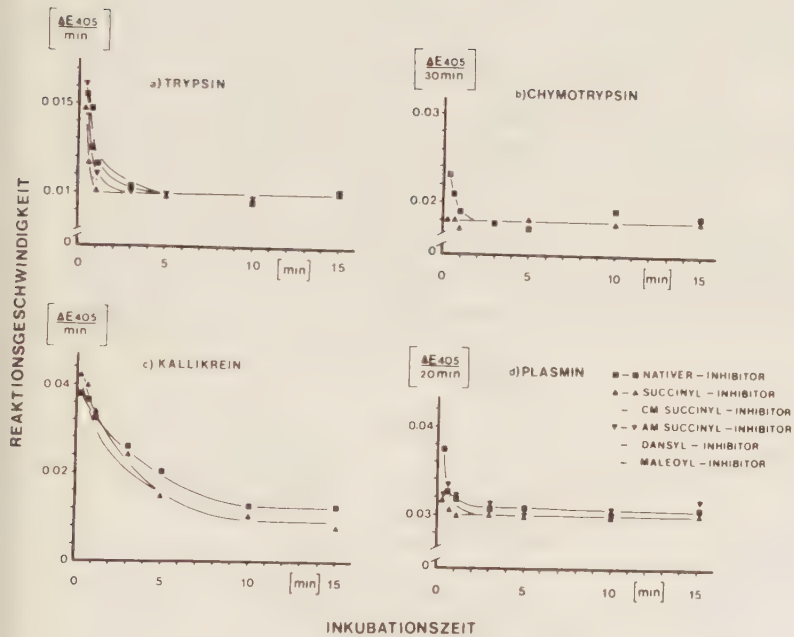


Abb. 17: Inkubationszeiten von Aprotinin und seinen acylierten Derivaten mit proteolytischen Enzymen bis zur Ausbildung der optimalen Hemmung (70 %). Bedingungen s. Abb. 16.

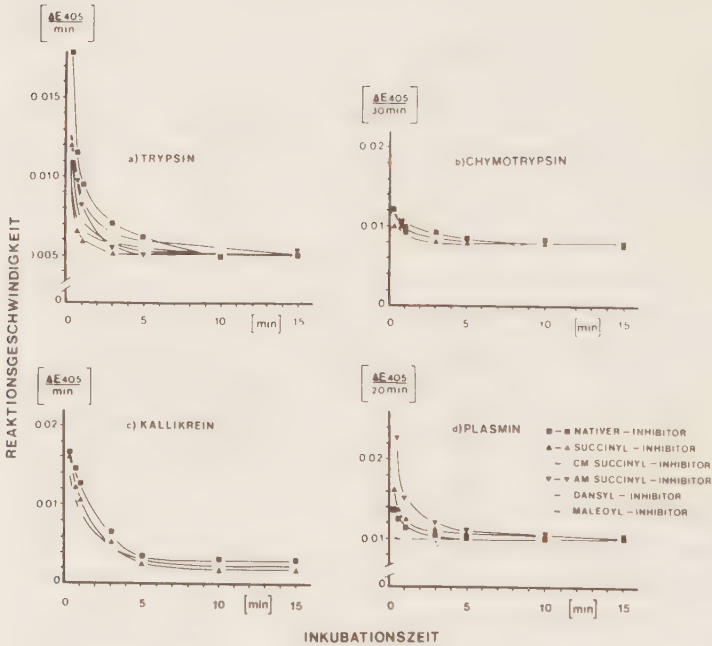


Abb. 18: Inkubationszeiten von Aprotinin und seinen acy-
lierten Derivaten mit proteolytischen Enzymen
bis zur Ausbildung der optimalen Hemmung (90 %).
Bedingungen s. Abb. 16.

4.1.3.4 Pentamaleoylderivat_des_Aprotinins.

Das in Abb. 19 dargestellte Chromatogramm zeigte eindeutig, daß sich zwischen inaktivem Pentamaleoyl-Aprotinin und Trypsin kein Komplex mehr bilden konnte. Der erste Gipfel, der vom Trypsin herrührte, war bereits relativ niedrig. Hätte das Trypsin mit dem modifizierten Inhibitor einen Komplex gebildet, wo wäre dieser im Elutionsdiagramm eher erschienen und hätte vor allen Dingen wegen der sehr starken Absorption der Doppelbildung der Maleoylgruppe bei 260 nm einen deutlich größeren Ausschlag gezeigt. Der Pentamaleoylinhibitor ist somit mit keiner Hemmaktivität mehr ausgestattet, im Gegensatz zum im Komplex mit Trypsin geschützten Tetramaleoylinhibitor (s.o.).

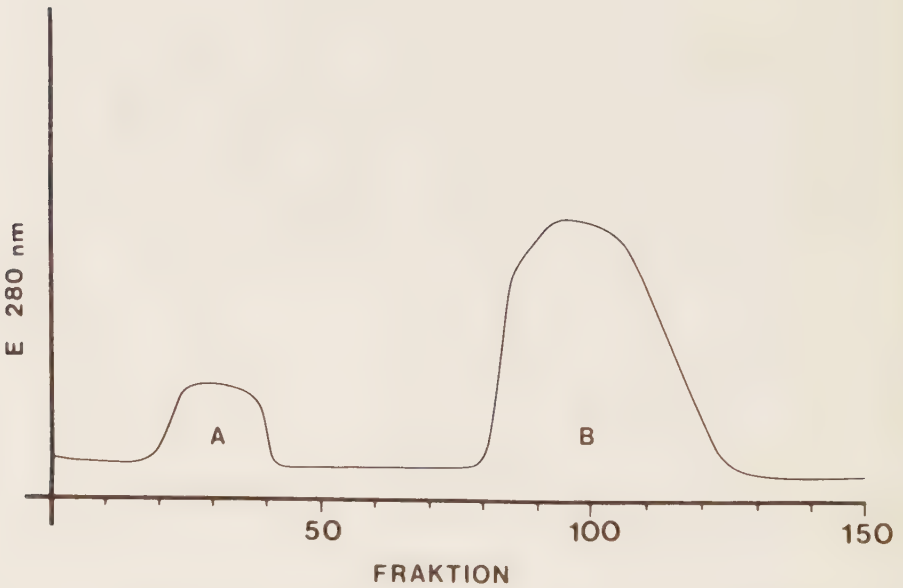


Abb. 19: Chromatogramm der Gelfiltration von Pentamaleoyl-
aprotinin an Sephadex G-50.

A Trypsin,

B Pentamaleoyl-Aprotinin.

Aus dem inaktiven Pentamaleoylinhibitor lassen sich aber unter definierten Bedingungen die Maleinsäurereste wieder abspalten. Hierzu wurde die Inhibitorlösung für 15 min auf 60° bei pH 2,0 erwärmt, wodurch 33 % an aktivem Inhibitor wieder freigesetzt werden konnten. Wurde noch für längere Zeit erhitzt, so fand sich nach 2 h 100 % der Inhibitoraktivität wieder (Abb. 20). Daraus folgte, daß der inaktive Pentamaleoylinhibitor bei 60°C und pH 1,0 innerhalb von 2 h nahezu quantitativ von den Maleoylgruppen befreit wurde.

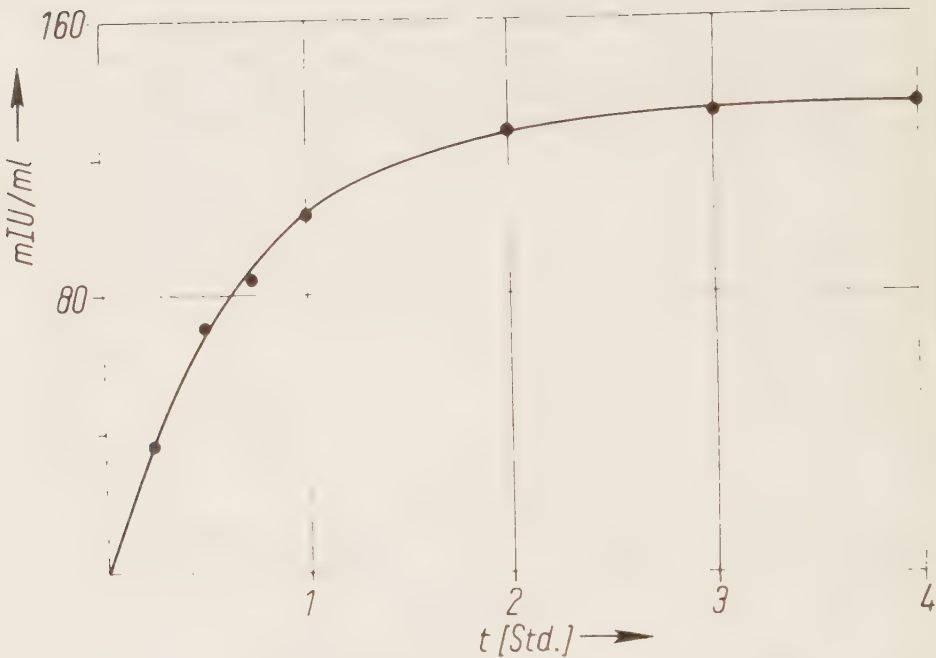


Abb. 20: Freisetzung von aktivem Aprotinin aus inaktivem Pentamaleoylaprotinin durch Erhitzen auf 60°C bei pH 1,0.

Ordinate: Freigesetzte Inhibitoreinheiten (Aktivität gegen Trypsin) nach verschiedenen Inkubationszeiten.

Abszisse: Zeit in Stunden. Sonstige Bedingungen s. Methodik.

4.1.3.5 Derivate des Aprotinins mit Aminogruppenreagenzien.

Die Hemmaktivität des dansylierten und Dimethylphenylcyanatinhibitors gegenüber Trypsin ist in Abb. 21 dargestellt. Wie bei den acylierten Inhibitoren war auch bei den Umsetzungen mit Aminogruppenreagenzien keine der modifizierten Inhibitoren aktiver als das aktive Aprotinin. Der Verlust an Hemmaktivität war dabei bei der Dansylierung am größten und betrug insgesamt 64,5 %.

Bei der Untersuchung der Hemmung durch die beiden genannten Aprotininderivate gegenüber Trypsin wurden die in Abb. 16 dargestellten Ergebnisse erhalten. Demnach war der dansylierte Inhibitor gegenüber Chymotrypsin relativ aktiver als gegenüber Trypsin; gegenüber Kallikrein und Plasmin wurden ähnliche Resultate erhalten. In allen Fällen wurden dabei optimale Inkubationszeiten für die Ermittlung des Hemmgrades eingehalten.

Inhibitor	Spezifische Aktivität (ImU/nMol)	Relative Aktivität
Nativer Inhibitor	24,4	1,0
Dansylierter Inhibitor	8,15	0,33
Dimethylphenylcyanatderivat des Aprotinins	10,44	0,43

Abb. 21: Vergleich der spezifischen Aktivitäten von Aprotinin und seinen Derivaten mit Aminogruppenreagenzien gegenüber Trypsin.

Bestimmung der Hemmung mit dem BAPNA-Test (vgl. Methodik). Bei den relativen Aktivitäten ist Aprotinin = 1,0. Der Vergleich wurde bei 50 %iger Hemmung durchgeführt.

4.1.3.6 Selektiv reduziertes Aprotinin und Derivate von bereits modifiziertem Aprotinin.

Die reduktive Spaltung der Disulfidbrücke Cys (14/38) im Aprotinin mit NaBH_4 lieferte nach Umsetzung mit verschiedenen Sulfhydrylgruppen-Reagenzien modifizierte Inhibitoren, deren Hemmverhalten gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin folgende Ergebnisse zeitigte (Abb. 22).

Danach verlor der Carboxymethylinhibitor gegenüber allen Proteasen seine volle Aktivität. Lediglich beim Plasmin wurde noch 11 % gefunden. Beim Carboxyamidomethylinhibitor war die Hemmung gegenüber Chymotrypsin gleich 0, gegenüber Trypsin und Plasmin aber kaum gegenüber dem nativen Inhibitor verändert. Auch der Aminoäthylinhibitor hatte keine Hemmaktivität mehr gegenüber Chymotrypsin. Dieser Befund muß als interessant angesehen werden, da offensichtlich durch die Modifizierung eine stärkere Selektivität der Hemmung eintritt.

Inhibitor	Prozent Hemmung von Proteasen durch modifizierte Aprotinine			
	Trypsin	Chymotrypsin	Kallikrein	Plasmin
Nativer Inhibitor	50	50	50	50
Carboxymethylinhibitor	0	0	0	11
Carboxyamidomethyl- inhibitor	44	0	21	42
Aminomethylinhibitor	30	9	54	42

Abb. 22: Relative Hemmaktivität von an der Disulfidbrücke
(Cys 14/38) reduzierten und modifizierten Inhibito-
ren.

Nativer Inhibitor mit Trypsin und den Proteasen wurde bei 50 %iger Hemmung durchgeführt. Die Inhibitoren wurden in gleicher molarer Konzentration zugegeben (vgl. Abb. 16).

4.1.3.7 Tetramaleoyl-homoarginininhibitor.

Auch die Umsetzung des Tetramaleoyl-Aprotinins mit O-Methylisoharnstoff führt nicht zu einem gegenüber Proteasen inaktiven Inhibitor, sondern behielt 100 % seiner relativen Aktivität im Vergleich zum Trasylol^R. Die Frage, ob die Umsetzung an allen Lysyl-15-Resten erfolgt war, wurde durch nachfolgende Inkubation mit Maleinsäureanhydrid untersucht. Es war zu erwarten, daß im Falle der Maleoylierung von Lysin-15 der modifizierte Inhibitor gegenüber Trypsin inaktiv wurde, da ja der Tetramaleoylinhibitor in den Pentamaleoylinhibitor umgesetzt wurde. Nach 45 min Inkubation wurden aber im Ansatz mit Trypsin 97 % der eingesetzten Aktivität wiedergefunden. Somit mußte auch das Lysin-15 im Aprotinin vollständig zum Homoarginin umgesetzt worden sein.

Durch Butadion-(2,3)-Reagenz wurden der Tetramaleoyl- und Tetramaleoyl-homoarginininhibitor in unterschiedlicher Weise inaktiviert (Abb. 23). Während die Aktivität des Tetramaleoylinhibitors innerhalb 1 h bereits um mehr als 80 % abnahm, behielt der Tetramaleoyl-homoarginininhibitor auch nach 5 h Inkubation noch 50 % seiner Aktivität.

Butadion-(2,3)-Reagenz wirkt auf folgende Weise: es modifiziert spezifisch Guanidingruppen (GROSSBERG und PRESSMAN, 1968).

Die Hemmkurve des guanidierten Inhibitors (Abb. 24) verlief über einen weiten Bereich gleichsinnig mit der vom nativen Inhibitor. Die Abweichung bei etwa 75 - 90 % Hemmung muß ebenfalls als minimal angesehen werden. Da die spezifische Aktivität außerdem nur um 4,8 % beim Kallikrein von der des Trasylol^Rs abwich (keine Unterschiede in der Hemmung des Trypsins), muß dieses Inhibitorderivat neben dem Tetramaleoylinhibitor als interessant für Versuche in vivo angesehen werden.

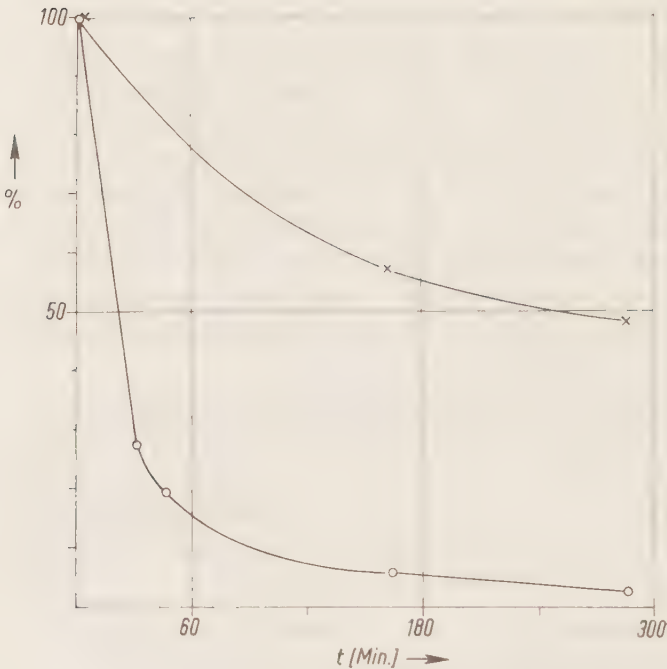


Abb. 23: Inaktivierungsgeschwindigkeit des Tetramaleoyl-
inhibitors (x—x) und des Tetramaleoyl-(15-
homoarginin)-inhibitors (o—o) bei Einwirkung
des Butadion-(2,3)-Reagenz.

784 ImU Tetramaleoyl-15-homocysteininhibitor (26 nMol) und 458 ImU Tetramaleoylinhibitor (15 nMol) wurden mit 3,4 nMol Butadionreagenz (86) bei pH 8,6 und Raumtemperatur inkubiert. Der Trypsintest wurde durch das Reagenz nicht beeinflusst.

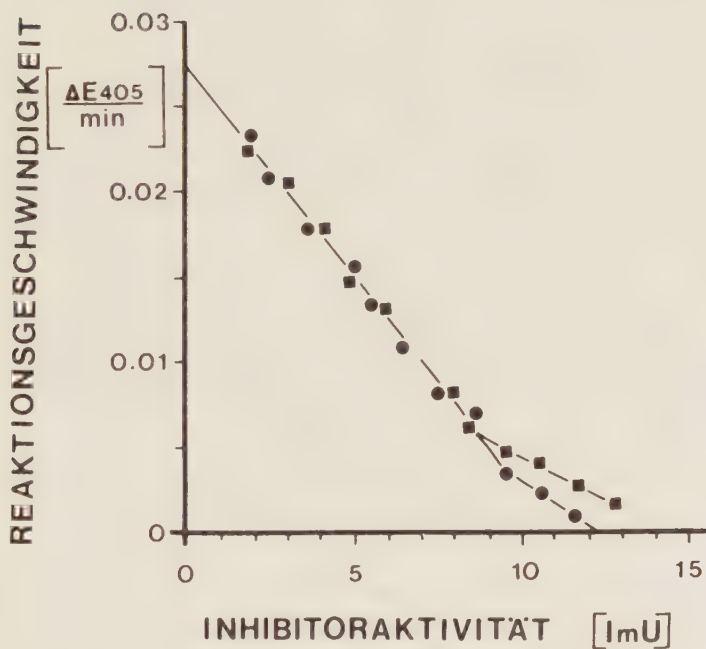


Abb. 24: Hemmung von Trypsin durch natives ● und Tetra-maleoyl-15-homoargininaprotinin ■. Inkubation von gleichen spezifischen Aktivitäten an beiden Inhibitoren (50 % Hemmung). Ansatz für Trypsin s. Methodik.

4.1.3.8 Tetramaleoyl-(15-N^ε-carbamoyl-lysine)-Aprotinin.

Die Umsetzung von Tetramaleoyl-Aprotinin mit Kaliumcyanat führte innerhalb von 48 h zum 15 N^ε-carbamoylierten Lysinderivat des Inhibitors, dessen spezifische Aktivität nur mehr 36 % von dem des Trasylol^Rs betrug. Dies steht im deutlichen Gegensatz zur Guanidierung des maleoylierten Inhibitors. Man kann somit eine Reihe für den Inaktivierungseffekt durch Umsetzung von Lysin-15 mit Aminogruppenreagenzien aufstellen, wobei Guanidierung keinen signifikanten Effekt hat, Carbamoylierung etwa einen 60 %igen Effekt und Maleoylierung einen 100 %igen Effekt.

Die Frage, ob die Umsetzung mit Kaliumcyanat an allen Lysin-15-Resten des modifizierten Inhibitors erfolgt war, wurde wie beim Tetramaleoyl-15-homoarginininhibitor durch nachfolgende Inkubation mit Maleinsäureanhydrid untersucht. Nach Inkubation für 45 min wurde aber 95 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität vom Tetramaleoylcarbamoyl-Aprotinin wiedergefunden. Somit mußte wiederum das Lysin-15 im Aprotinin vollständig zum 15 N^ε-carbamoyllysine umgesetzt worden sein.

Die Hemmkurve des carbamoylierten Inhibitors (Abb. 25) verlief nicht mit der des nativen Inhibitors gleichsinnig. Der Aktivitätsverlust wurde damit über den gesamten Hemmbereich beobachtet. Auch wurde mit sehr hohen Inhibitormengen keine 90 - 100 %ige Hemmung erzielt, sondern bei etwa 60 % wurde keine Zunahme der Hemmung mehr beobachtet.

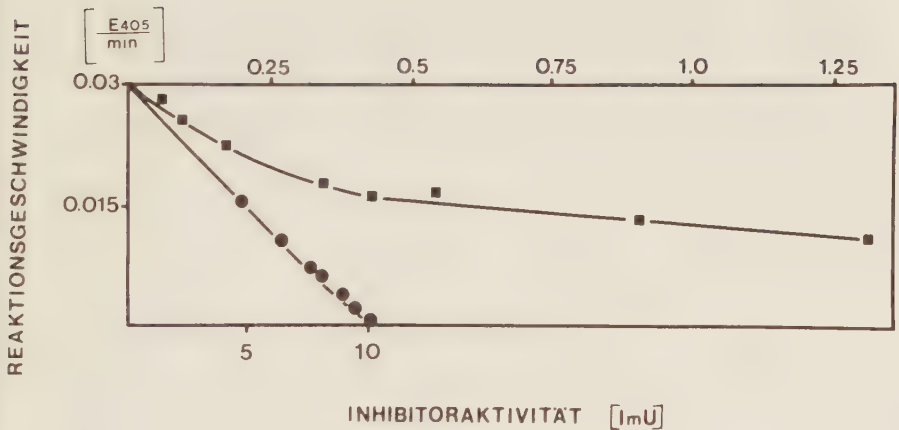


Abb. 25: Hemmung von Trypsin durch natives ● und Tetra-maleoyl-(15-N ϵ -carbamoyl-lysine)■-Aprotinin.

Inkubationsbedingungen s. Methodik. Die Ermittlung der entsprechenden Inhibitoraktivitäten (Abszisse) wurde aus Abb. 15 durch die entsprechenden spezifischen Aktivitäten gegenüber Trypsins erhalten. Die Enzymaktivitäten in den Ansätzen betrugen 10 mU (10 μ g) Trypsin. Die Konzentration des modifizierten Inhibitors ist am oberen Rand der Abbildung angegeben (nMol).

4.2 AUSBEUTEBESTIMMUNGEN BEIM UMSATZ VON APROTININ MIT DEN VERSCHIEDENEN REAGENZIE

In Abb. 26 sind die Ausbeuten für verschiedene Umsetzungen von Aprotinin mit Aminogruppen- und SH-Gruppenreagenzien dargestellt. Polyglutaminsäure-Aprotinin wurde zu 88 % wiedergefunden, ebenso Albumin-Aprotinin mit hoher Aktivität. Dagegen wiesen Dansyl-Aprotinin und Aminoäthylaprotinin nur noch eine geringe Aktivität auf. Von den acylierten Inhibitoren ist in Abb. 26 nur der maleoylierte Inhibitor aufgeführt. Doch ergaben die anderen Produkte, die mit cyclischen Anhydriden synthetisiert wurden, ebenfalls alle Ausbeuten um 85 %.

Inhibitor	Einsatz an Aprotinin (ImU)	Ausbeute an Aprotinin	
		(ImU)	%
Polyglutaminsäure-Aprotinin	27 000	18 400	88
Albumin-Aprotinin	15 000	12 400	83
Tetramaleoyl-Aprotinin	7 500	6 350	85
Dansyl-Aprotinin	190 000	67 000	35
Dimethylphenylcyanat-Aprotinin	187 000	118 000	60,5
Tetramaleoyl-(15 N ^ε -carbamoyl-lysin)-Aprotinin	16 500	8 745	53
Tetramaleoyl-homoarginin-Aprotinin	22 600	19 250	85
Carboxyamidomethylaprotinin	87 000	72 000	83
Carboxymethylaprotinin	90 000	65 700	73
Aminoäthylaprotinin	87 000	45 000	52

Abb. 26: Ausbeutebestimmung beim Umsatz des nativen Aprotinins mit verschiedenen Reagenzien.

Zur Bestimmung der Aktivität und Präparation der Ansätze s. Methodik.

4.3 PHARMAKOKINETIK VERSCHIEDENER INHIBITORORDERIVATE

Die Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Aprotinin und seinen Derivaten wurden wegen des Aufwands zunächst nur mit 5 verschiedenen Stoffen durchgeführt.

Abb. 27 zeigt die Plasmaspiegel. Angaben über die Erstverteilung der Substanzen wurden nicht gemacht, da sie für eine längere Verweildauer im Organismus nicht entscheidend waren. Der erste Wert wurde nach 30 min gemessen und ergab für Albumin-Aprotinin und Tetramaleoyl-Aprotinin die höchsten Spiegel. Überraschenderweise wurde Albumin-Aprotinin in der Leber gespeichert und erschien nach 24 h wieder in hoher Konzentration im Blut. Die acylierten Inhibitoren waren nach 24 h noch innerheblicher Konzentration vorhanden, die Werte sprachen ebenfalls für eine Redistribution im Plasma. Im Harn wurde nach 24 h vom nativen Inhibitor nur 8 % gefunden, von den modifizierten Inhibitoren dagegen etwa 70 % (Abb. 28). Dieser hohe Prozentsatz wurde aber nach verschiedenen Verweilzeiten im Organismus erreicht. Am schnellsten wurde das carboxymethylmercaptosuccinylierte Aprotinin im Harn ausgeschieden.

Von den Geweben nimmt vor allen Dingen die Niere (Abb. 29) große Mengen an Inhibitor auf. Dies gilt sowohl für das native als auch das Albumin-Aprotinin. Entsprechend niedrig ist deshalb auch sein Gehalt im Plasma und Harn. Bei den acylierten Inhibitoren findet man die Aktivitäten vor allem im Plasma und Harn, aber keine wesentliche Speicherung in den Nieren. Die injizierten Inhibitoren verteilen sich damit vor allem auf diese drei Kompartimente, weniger auf die übrigen Organe und vor allem nicht selektiv auf das Pankreas. Dies hat für ihre Wirksamkeit bei der Pankreatitis eine erhebliche Bedeutung.

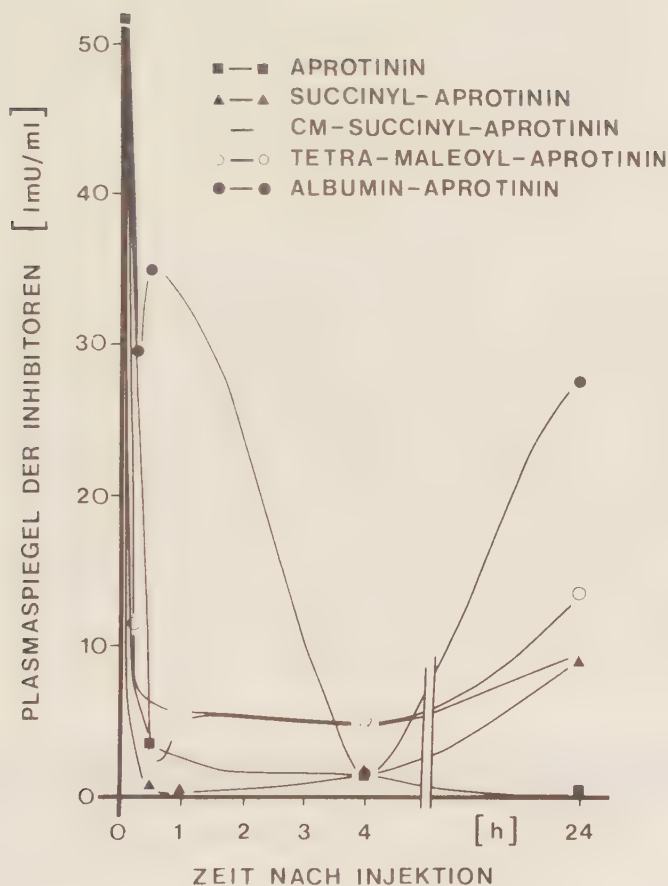


Abb. 27: Plasmaspiegel von Aprotinin und verschiedenen modifizierten Inhibitoren.

Mittelwerte von drei Bestimmungen. Es wurden jeweils 1 IU/100 g Lebendgewicht injiziert. Der Inhibitorgehalt wurde mit dem Trypsintest bestimmt.

Inhibitor	Prozent der injizierten Aktivität nach		
	1 h	4 h	24 h
Natives Aprotinin	-	-	8
Tetramaleoyl-Aprotinin	14	64	67
Succinyl-Aprotinin	32	65	68
CM-mercaptosuccinyl-Aprotinin			

Abb. 28: Prozente der injizierten Inhibitoraktivität verschiedener Aprotinine im Harn der weiblichen Ratte.

Gesamtinhibitormenge = 100 %. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

Inhibitor	Aktivität (mIU/g) nach				Prozent der injizier- ten Aktivität nach			
	30min	1h	4h	24h	30min	1h	4h	24h
Natives Aprotinin	378	780	1040	820	29	60	80	63
Albumin-Aprotinin	512	586	912	872	39	45	70	67
Maleoyl-Aprotinin	75	104	54	45	6	7	4	3
Succinyl-Aprotinin	31	28	42	12	2	2	3	1
CM-Succinyl-Aprotinin	25	75	116	71	2	6	8	6

Abb. 29: Gehalt an nativem Aprotinin und seinen Derivaten in der Niere nach i.v. Injektion bei der weiblichen Ratte.

Injektion von 1 IU/100 g Lebendgewicht. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

In der Leber wurde von allen untersuchten Inhibitoren vor allem das Albumin-Aprotinin gespeichert, während die Aufnahme der übrigen Stoffe nur geringfügig war (Abb. 30). Lunge, Milz und Pankreas zeigten sowohl auf Konzentrations- als auch auf Prozentbasis eine geringe Inhibitorspeicherung (unter 5 ImU/g), das Pankreas sogar nur 1 ImU/g und damit nur etwa 0,1 % der applizierten Dosis.

Inhibitor	Aktivität (mIU/g)				Prozent der injizierten Aktivität nach			
	30min	1h	4h	24h	30min	1h	4h	24h
Natives Aprotinin	13	13	17,1	130	4,6	4,6	6,1	4,5
Albumin-Aprotinin	32	64,5	84	40,5	11,5	23,0	30,0	14,5
Maleoyl-Aprotinin	4,2	5,2	8,4	3,6	1,5	1,4	3,0	1,0
Succinyl-Aprotinin	2,7	2,8	3,0	3,2	0,9	1,0	1,2	1,1
CM-Succinyl-Aprotinin	2,3	2,0	3,6	3,9	0,7	0,7	1,1	1,1

Abb. 30: Gehalt an nativem Aprotinin und seinen Derivaten in der Leber nach i.v. Injektion bei der weiblichen Ratte.

Injektion von 1 IU/100 g Lebendgewicht. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen.

5. DISKUSSION

Bei der Entwicklung neuer Pharmaka sind so viele Gesichtspunkte zu berücksichtigen, daß sie den Rahmen einer Dissertation in vieler Hinsicht sprengen. Heute ist es auch üblich, in pharmazeutischen Konzernen Gruppen mit der Arzneimittelentwicklung zu beschäftigen, die neben den synthetisch und analytisch arbeitenden Chemikern auch Galeniker, Pharmakologen, Toxikologen, Biochemiker, Immunologen und schließlich klinische Pharmakologen (Pharmakokinetikexperten) und klinisch erfahrene Ärzte (überwiegend Internisten und Chirurgen) enthalten. Beispiele für derartige Gruppen mit hervorragenden Erfolgen waren die von J.W. BLACK bei ICI (Imperial Chemical Industries, England) im Falle des β -Blockers Propranolol (BLACK, 1962; BLACK et al., 1964) und wiederum die von J.W. BLACK bei SKF (Smith, Kline und French, Welwyn Garden City) im Falle des H_2 -Rezeptorantagonisten Metiamide (BLACK et al., 1974).

Spezielle Fragen und bestimmte gedankliche Richtungen in der Arzneimittelentwicklung lassen sich aber auch heute noch mit Erfolg an der Hochschule untersuchen. Hieraus nahmen wir die Berechtigung, das bereits im Handel befindliche, in seiner Wirkaktivität aber nicht genügend befriedigende Aprotinin (Trasylol^R) einer chemischen Modifizierung zu unterziehen und in verschiedene Richtungen zu weisen, die zu einer Verbesserung des Präparates führen könnten. In mühevoller Kleinarbeit gelang es uns in den letzten fünf Jahren, ein Modell der experimentellen Pankreatitis aus den zahllosen Angeboten in der Literatur herauszusuchen, das sich als zuverlässig erwies. Dieses sog. Pfeffermodell am Hund (PFEFFER et al., 1957) besteht in einer Operation, die aus dem Duodenum einen Blindsack macht, in den nur noch

das Pankreas sein Sekret drainiert und in dem sich nur mehr Duodenalsaft mit diesem Sekret mischt, also nicht mehr Galle, Magensaft und Mageninhalt. 15 - 22 h nach dieser Operation am Hund (Experimente bisher an 30 Tieren) verstarben die Tiere im pankreogenen Schock. Die pathologisch-mikroskopische Analyse ergibt in allen Fällen eine schwere, hämorrhagisch nekrotisierende Pankreatitis. Es ist das über diese Dissertation hinausgehende Ziel unserer Arbeit, an diesem Modell die Wirksamkeit der modifizierten Inhibitoren zu testen. In dieser Arbeit interessierten in erster Linie Fragen der chemischen Synthese, der biochemischen Wirksamkeit der Inhibitoren, sowie der Pharmakokinetik.

Das native Aprotinin fand ja wegen seines breiten Hemmspektrums gegenüber Proteasen (WERLE et al., 1952; WERLE und KAUFMANN-BOETSCH, 1960) rasch Eingang in die Klinik. Es war leicht aus den Geweben zu isolieren. Außerdem besaß es ein relativ niedriges Molekulargewicht, so daß einerseits seine Diffusion aus dem Plasma ins Interstitium und an den Ort seiner Wirksamkeit stark begünstigt war und andererseits keine Antikörperbildung zu erwarten war. Seine Verträglichkeit war außerordentlich gut. Die letale Dosis LD_{50} bei der Maus lag bei 375 mg Reinsubstanz/kg Körpergewicht (BEUCHELT, 1963). Ein Nachteil bei seiner Anwendung bestand aber darin, daß Aprotinin sehr schnell aus dem Plasma verschwand und in den Nieren gespeichert wurde, bevor es in biologisch meist inaktiver Form (94 %) im Urin erschien. Versuche mit tritiummarkiertem Aprotinin ergaben, daß die H^3 -Aktivität im Urin in dem Maße zunahm, in dem die biologische Aktivität in den Nieren sich verringerte. Nach sechs Tagen fand man 70 % der Radioaktivität im Harn wieder, aber kaum noch Hemmaktivität (TRAUTSCHOLD et al., 1964).

Zur Vermeidung dieses Nachteils wurde versucht, den Inhibitor chemisch so zu verändern, daß er möglichst lange im Plasma blieb oder die Nieren ungehindert passierte. Zu diesem Zwecke wurden verschiedene Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors synthetisiert. Dabei sollte der isoelektrische Punkt durch Einführen von sauren Gruppen verändert oder das Molekül so vergrößert werden, daß die Derivate zwar ihre biologische Aktivität behielten, nicht aber in den Nieren fixiert werden konnten und deshalb länger als bisher und auch in höherer Konzentration im Blute kreisen würden. So wurde der breitspezifische Kallikrein-Trypsin-Inhibitor Aprotinin unter milden Bedingungen ($t = 0^{\circ}\text{C}$; pH 8,5) (1) mit den N-Carboxyanhydriden von Glutaminsäure, Serin und Alanin umgesetzt, (2) mit Äthandial an Albumin gekoppelt, (3) im Trypsinkomplex mit verschiedenen zyklischen Anhydriden in die entsprechenden Acylderivate überführt.

(1) Beim Umsatz des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors mit den N-Carboxyanhydriden reagierten die α -Aminogruppe des N-terminalen Arginins und die 4 ϵ -Aminogruppen des Lysins unter Bildung von insgesamt 5 neuen Peptidbindungen, wobei gleichzeitig 7 freie neue α -Aminogruppen im Molekül entstanden. Im Falle des N-Carboxyanhydrids der Glutaminsäure fand aber neben der Vergrößerung des Moleküls noch eine beträchtliche Ladungsverschiebung innerhalb des Moleküls durch die Einführung von jeweils einer zusätzlichen γ -Carboxylgruppe pro Glutaminsäurerest statt. Die neu entstandenen α -Aminogruppen konnten ihrerseits mit überschüssigem N-Carboxyanhydrid weiterreagieren, so daß der saure Charakter des Moleküls mit jedem neu hinzukommenden Glutaminsäurerest weiter zunahm (Abb. 33). Der so entstandene modifizierte Inhibitor war biologisch immer noch stark aktiv und erwies sich in Experimenten am Hund hinsichtlich einer verlängerten Verweildauer im Plasma als außerordentlich günstig (OPPITZ, 1969).

(2) Interesse verdient ferner das Albumin-Aprotinin.

Zwei Drittel des im Blutplasma enthaltenen Proteins ist Albumin, ein rotationselliptisch geformter Eiweißkörper mit hoher kolloidosmotischer Wirkung und mit Vehikelfunktion. Sein Molekulargewicht beträgt 69 000 Daltons. Es enthält 56 Lysinreste und gehört zu den Proteinen mit der größten negativen Ladung. Der isoelektrische Punkt liegt bei 4,6. Da es nicht antigen wirkt, ruft es auch keine Antikörperbildung hervor. Deshalb schien es besonders gut als Kopplungssubstanz für Aprotinin geeignet.

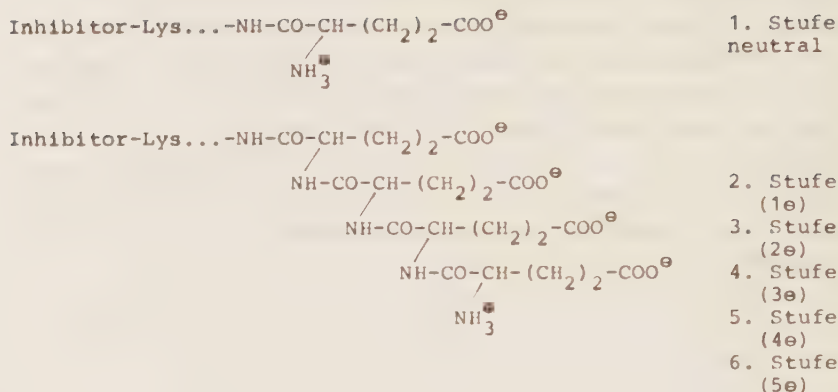


Abb. 3: Schematische Darstellung der Reaktion von N-Carboxy-
anhydrid der Glutaminsäure mit den 5 freien Amino-
gruppen von Aprotinin.

Unter Verwendung von Äthandial als Kopplungsreagenz wurde Aprotinin über zwei kovalente Bindungen (Schiff'sche Basen) an Albumin gebunden. Da in Vorversuchen gefunden wurde, daß die Bildung der Schiff'schen Basen, die im schwach-sauren Milieu instabil waren, sich am besten in der Nähe des isoelektrischen Punktes von Albumin vollzogen, wurde zunächst Albumin in neutraler Lösung mit Äthandial umgesetzt. Anschließend wurde das pH auf 10,5 gebracht und der Kallikrein-Trypsin-Inhibitor zum Reaktionsgemisch gegeben. Ratten i.v. injiziert, ergab sich, daß das Reaktionsprodukt eine höhere Halbwertszeit im Serum hatte als der native Inhibitor und zunächst - über Stunden - in der Leber deponiert wurde, um später wieder im Plasma zu erscheinen. Da der Inhibitor nichts an biologischer Wirksamkeit verlor, erschien er ebenfalls für Experimente *in vivo* geeignet.

(3) Schließlich wurden Versuche mit verschiedenen fünf-gliedrigen zyklischen Anhydriden durchgeführt, um definierte Derivate des Kallikrein-Trypsin-Inhibitors mit deutlich niedrigeren isoelektrischen Punkten zu erhalten als beim nativen Aprotinin.

Im Arbeitskreis von B.S. HARTLEY (BUTLER et al., 1967 und 1969) wurde eine reversible Blockierung von Eiweißaminogruppen durch Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid vorgenommen. Das Anhydrid der Maleinsäure reagierte mit Aminogruppen unter Bildung von Amidgruppen, die im Sauren nicht stabil waren. Das war darauf zurückzuführen, daß die Maleinsäure relativ leicht einen Fünfring bildet, durch den die Bindung an die Aminogruppe wieder gespalten wurde. Die Acylierung der Aminogruppen war aber auch mit Bernstein-säureanhydrid und seinen Derivaten möglich, ein Prozeß, der sich als irreversibel erwies.

Bei unseren Versuchen ergab sich zunächst, daß die Substitution aller 5 freien Aminogruppen des Aprotinins mit Acylresten ein biologisch inaktives Produkt lieferte. Das war zu erwarten, denn die ursprünglich vorhandene positive Ladung der ϵ -Aminogruppe im reaktiven Zentrum am Lysinrest in Position 15 wurde durch eine negative Ladung der Carboxylgruppe in der Maleinsäure ersetzt. Die volle biologische Aktivität wurde aber innerhalb von 2 h zurückerlangt, wenn man das Produkt in 0,4 M HClO_4 auf 60°C erhitzte und dadurch alle Maleinsäurereste wieder abspaltete. Um nun aktive Derivate des Inhibitors zu erhalten, komplexierten wir analog den Alanierungsexperimenten von J. CHAUVET und R. ACHER (1967) den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor mit Trypsin, bevor wir die Umsetzung mit Maleinsäureanhydrid, Bernsteinsäureanhydrid und deren Derivaten vornahmen. Nach der Acylierung spalteten wir mittels einer salzsauren Harnstofflösung die Trypsin-Inhibitor-Komplexe und fällten das entsprechende Trypsin-Derivat im Ammoniumsulfat oder Trichloroessigsäure aus. Im Überstand blieben die inhibitorisch aktiven Reaktionsprodukte, - mehrfach acylierte Kallikrein-Trypsin-Inhibitoren -, zurück, von denen wir erwarteten, daß sie nach i.v.-Gabe nicht in den Nieren fixiert werden würden.

Die zunächst durchgeführten Experimente über die biologische Wirksamkeit dieser modifizierten Inhibitoren konnten voll befriedigen. Auch wurden mit dem Maleoyl-Aprotinin, Succinyl-Aprotinin und Carboxymethylmercaptosuccinyl-Aprotinin etwa 10-fach höhere Plasmaspiegel erzielt als mit dem nativen Trasylol^R. Weiterhin wurden die 3 genannten Inhibitoren nicht im wesentlichen Maße in der Niere und Leber gespeichert, sondern innerhalb 24 h im Harn ausgeschieden (Abb. 29 - 31 dieser Arbeit). Diese Ergebnisse erschei-

nen so vielversprechend, daß Untersuchungen ihrer Wirksamkeit bei der Pankreatitis des Hundes vorgenommen werden sollten, um die Prüfung ihres Wertes als Arzneimittel beim Menschen in die Wege zu leiten.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

6.1 In der vorliegenden Arbeit wurde die Synthese verschiedener Derivate des breitspezifischen Proteinase-Inhibitors aus Rinderorganen (Aprotinin, Trasylol^R) beschrieben. Sie geschah Überwiegend mit der Zielsetzung, dieses prinzipiell wertvolle Arzneimittel in seiner biologischen Wirksamkeit zu verbessern, indem höhere Blutspiegel, geringere Speicherung in der Niere und erhöhte Ausscheidung im Harn erzielt werden konnten.

6.2 Mit N-Carboxy-Anhydriden der Glutaminsäure, Alanin und Serin wurden Polyaminosäurederivate hergestellt, mit Albumin und Äthandial ein hochmolekularer modifizierter Inhibitor und mit zyklischen Anhydriden von Dikarbonsäuren Acyl-derivate des Aprotinins. Diese Inhibitoren wurden eingehend auf ihre Hemmwirkung gegenüber Trypsin, Chymotrypsin, Kallikrein und Plasmin untersucht, sowie ihr pharmakokinetisches Verhalten bei der Ratte festgestellt. Daneben wurden noch Derivate von Aprotinin mit Aminogruppenreagenzien (Dansylchlorid und 2,4-Dimethylphenylcyanat), mit O-Methylisoharnstoff und Kaliumcyanat sowie nach Reduktion von Cys (14/38) durch NaBH₄ mit verschiedenen Sulfhydrylreagenzien hergestellt. Der Grund für diese Synthesen lag in Untersuchungen der Struktur-Wirkungsbeziehung, d.h. in der Untersuchung der inhibitorischen Wirksamkeit gegenüber den o.g. vier proteolytischen Enzymen.

6.3 Die chemische Konstitution von Aprotinin und den modifizierten Inhibitoren wurde mit Aminosäureanalyse nach Hydrolyse am Beckman -Aminosäure-Analysator, mit Elektrophorese auf Acetatfolie und mit Bestimmung der freien Aminogruppen durch drei verschiedene Verfahren festgestellt. Auch die inhibitorische Wirksamkeit wurde zur Konstitutionsermittlung mit herangezogen, z.B. beim Tetra- und Pentamaleoyl-Aprotinin.

6.4 Natives Aprotinin hemmte Trypsin und Kallikrein wesentlich stärker als Chymotrypsin und Plasmin. Die Verhältnisse der spezifischen Hemmaktivität von Aprotinin gegenüber den vier Proteasen änderten sich bei den Polyaminosäurederivaten und beim Albuminaprotinin nicht. Bei den Acylderivaten aber traten hierbei verschiedene Änderungen auf, die evtl. therapeutische Interessen gewinnen könnten. So nahm bei den meisten Derivaten die Hemmwirkung gegenüber Kallikrein ab, gegenüber Chymotrypsin aber beim Carboxymethylmercaptosuccinyl-Aprotinin zu. Auch beim Plasmin nahm die Wirksamkeit der Derivate im Vergleich zu Trypsin im Falle des letzteren Inhibitors ab, so daß er mit größerer Berechtigung als ein Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor zu bezeichnen wäre. Die Veränderung der inhibitorischen Spezifität von Aprotinin durch chemische Modifizierung erscheint als ein außerordentlich interessantes Prinzip.

6.5 Chemische Modifizierung veränderte das pharmakokinetische Verhalten des Aprotinins bei der Ratte. Nativer Inhibitor wird außerordentlich rasch in der Niere gespeichert, während seine Plasmaspiegel bereits nach 30 min sehr niedrig sind. Mit den acylierten Inhibitoren werden etwa 10-fach höhere Plasmaspiegel bereits in den ersten 4 h erzielt,

die nach 24 h sogar noch auf das Doppelte zunahmen. Außerdem wurden die modifizierten Inhibitoren in biologisch wirksamer Form zum größten Teil im Harn ausgeschieden. Diese Eigenschaften lassen die acylierten Inhibitoren für Untersuchungen bei der Pankreatitis und beim pankreogenen Schock als sehr geeignet erscheinen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ANDERER, F.A., S. HÖRNLE:

Strukturuntersuchungen am Kallikrein-Inaktivator aus Rinderlunge. I. Molekulargewicht, Endgruppenanalyse und Aminosäurezusammensetzung.

Z. Naturforsch. 20 b, 454 - 462 (1965).

ANDERER, F.A.:

Strukturuntersuchungen am Kallikrein-Inaktivator aus Rinderlunge. II. Bestimmung der Aminosäuresequenz.

Z. Naturforsch. 20 b, 462 - 472 (1965).

ANDERER, F.A., S. HÖRNLE:

The disulfide linkages in kallikrein inactivator of bovine lung.

J. Biol. Chem. 241, 1568 - 1572 (1966).

ARMSTRONG, D., C.A. KEELE, J.B. JEPSON, J.W. STEWART:

Development of pain producing substance in human plasma. Nature 174, 791 - 792 (1954).

ASTRUP, T.:

A proteolytic inhibitor in lung tissue.

Proc. XVIII Int. Physiol. Congr. p. 81, Copenhagen (1950).

BEUCHELT, H.:

Trasylol, ein Proteinasen-Inhibitor, im Experiment und klinischer Anwendung.

Medizin und Chemie 7, 763 (1963).

BLACK, J.W.:

Chemical blockade of the cardiac effects of catecholamines and sympathetic nerve stimulation.

Proc. XXII Int. Physiol. Congr. ii, 92 (1962).

BLACK, J.W.:

Pharmacology of a new adrenergic beta-receptor blocking compound (with Stephenson, J.S.).
Lancet ii, 311 (1962).

BLACK, J.W.:

A new adrenergic beta-receptor antagonist. (with Crowther, Shanks, Smith and Dornhorst).
Lancet i, 1080 (1964).

BISCHOFF, F., A.H. ELLIOT:

Chemical studies of callicrein.
J. Biol.Chem. ii7, 7 - 10 (1937).

BLOW, D.M., C.S. WRIGHT, D. KUKLA, A. RÜHLMANN, W. STEIGEMANN, R. HUBER:

A model for the association of bovine pancreatic trypsin inhibitor with chymotrypsin and trypsin.
J. Mol. Biol. 69, 137 - 144 (1972).

BOISSONNAS, R.A., St. GUTTMANN, P.-A. JAQUENOUD, H. KONZETT, E. STÜRMER:

Synthesis and biological activity of peptides related to bradykinin.
Experientia 16, 326 (1960).

BUTLER, P.J.G., J.I. HARRIS, B.-S. HARTLEY, R. LEBERMAN:

Reversible blocking of peptide amino groups by maleic anhydride.
Biochem. J. 103, 78 P (1967).

BUTLER, P.J.G., J.I. HARRIS, B.S. HARTLEY, R. LEBERMAN:

The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains.
Biochem. J. 112, 679 - 689 (1969).

CARPI, A. A. PINTO CORRADO:

Cerebral vascular action of bradykinin in the dog.
Experientia 17, 326 - 327 (1961).

CERLETTI, A., E. STÜRMER, H. KONZETT:

Bradykinin. Strukturaufklärung, Synthese, physiologisch-pharmakologische Grundlagen.
Dtsch. Med. Wochenschr. 86, 678 - 683 (1961).

CHAUVET, J., G. NOUVEL, R. ACHER:

Structure primaire d'un inhibiteur pancréatique de la trypsine (inhibiteur de Kunitz et Northrop).
Biochim. Biophys. Acta 92, 200 - 201 (1964).

CHAUVET, J. R. ACHER:

The reactive site of the basic trypsin inhibitor of pancreas.
Z. Biol. Chem. 242, 4274 - 4275 (1967).

DE CARVALHO, J.F., C.R. KINIZ:

Kinin-forming enzyme (kininogenin) in rat kidney.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 116, 912 - 917 (1964).

DLOUHÁ, V., D. POSPÍŠILOVÁ, E. MELOUN, F. SORM:

On proteins XCIV. Primary structure of basic trypsin inhibitor from beef pancreas.
Collect. Czech. Chem. Commun. 30, 1311 - 1325 (1965).

EDERY, H.:

Potentiation of the action of bradykinin on smooth muscle by chymotrypsin, chymotrypsinogen and trypsin.
Br. J. Pharmacol. 22, 371 - 379 (1964).

EDERY, H.:

Further studies on the sensitization of smooth muscle to the action of plasma kinins by proteolytic enzymes.
Br. J. Pharmacol. 24, 485 - 496 (1965).

ELLIOTT, D.F., E.W. HORTON, G.P. LEWIS:

Actions of pure bradykinin.
J. Physiol. 153, 473 - 480 (1960).

ELLIOTT, D.F., E.W. HORTON, G.P. LEWIS:

The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood.
Biochem. J. 78, 60 - 65 (1961).

FIEDLER, F., B. MÜLLER, E. WERLE:

The inhibition of porcine pankreas kallikrein by Di-isopropyl-fluorophosphate . Kinetics, stöchiometry, and nature of the group phosphorylated.
Eur. J. Biochem. 10, 419 - 425 (1969).

FIEDLER, F., B. MÜLLER, E. WERLE:

Charakterisierung verschiedener Schweinekallikreine mittels Diisopropylfluorophosphat.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 1002 - 1006 (1970).

FIEDLER, F., C. HIRSCHAUER, E. WERLE:

Anreicherung von Präkallikrein B aus Schweinepankreas und Eigenschaften verschiedener Formen des Pankreaskallikreins.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 225 - 238 (1970).

FIEDLER, F., B. MÜLLER, E. WERLE:

Die Aminosäuresequenz im Bereich des Serins im akt. Zentrum des Kallikreins aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1463 - 1466 (1971).

FOX, R.H., S.M. HILTON:

Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation.
J. Physiol. 148, 219 - 232 (1958).

FOX, R.H., R. GOLDSMITH, D.J. KIDD, G.P. LEWIS:

Bradykinin as a vasodilator in man.
J. Physiol. 157, 589 - 602 (1961).

FREY, E.K.:

XXXV. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit.
Vorgetragen am 4. Sitzungstage der 50. Tagung der Deutschen
Gesellschaft für Chirurgie am 10. IV. 1926.
Arch. klin. Chir. 142, 663 - 669 (1926).

FREY, E.K., H. KRAUT, E. WERLE:

Kallikrein (Padutin).
Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1950.

FREY, E.K.:

Zur Therapie der Pankreatitis.
Therapiewoche 4, 323 (1953/54).

FREY, E.K., W. HARTENBACH:

Experimentelle Grundlagen der Wirkung von Depot-Padutin.
Dtsch. Med. Wochenschr. 78, 5 - 8 (1953).

FREY, E.K., H. KRAUT, E. WERLE:

Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren.
Ferdinand-Enke-Verlag, Stuttgart 1968.

FRIMMER, M.

Entzündungsstoffe.
Dtsch. Med. Wochenschr. 91, 33 (1966).

FRITZ, H., J. TRAUTSCHOLD, E. WERLE:

Bestimmung der Molekulargewichte von neuen Trypsin-Inhibi-
toren mit Hilfe der Sephadex-Gelfiltration.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 342, 253 - 263 (1965).

FRITZ, H., H. SCHULT, M. NEUDECKER, E. WERLE:

Isolation of protease inhibitors.
Angew. Chem. int. Ed. Engl. 5, 735 (1966).

FRITZ, H., H. SCHULT, M. NEUDECKER, E. WERLE:

Isolierung von Protease-Inhibitoren.
Angew. Chem. 78, 775 (1966).

FRITZ, H., J. ECKERT, E. WERLE:

Isolierung und Charakterisierung von sialinsäurehaltigem und sialinsäurefreiem Kallikrein aus Schweinepankreas.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1120 - 1132 (1967).

FRITZ, H., M. HUTZEL, I. HÜLLER, M. WIEDEMANN, H. STAHLHEBER, P. LEHNERT, M.M. FORELL:

Über das Sekretionsverhalten der spezifischen Trypsin-Inhibitoren und des Kallikreingens beim Pankreas von Hund und Mensch.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1575 - 1578 (1967).

FRITZ, H., K.-H. OPPITZ, D. MECKEL, B. KEMKES, H. HAENDLE, H. SCHULT, E. WERLE:

Verteilung und Ausscheidung von natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten Proteaseinhibitoren nach intravenöser Injektion bei Ratte, Hund (und Mensch).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1541 - 1550 (1969).

FRITZ, H., H. SCHULT, R. MEISTER, E. WERLE:

Herstellung und Eigenschaften von aktiven Derivaten des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 1531 - 1541 (1969).

FRITZ, H., J. TRAUTSCHOLD, E. WERLE:

"Protease-Inhibitoren" in: "Methoden der enzymatischen Analyse"
Herausg. v. H.U. BERGMAYER, Verlag Chemie Weinheim, 1021 - 1038 (1970).

GARDNER, L.I., W.W. WESTERFELD, J.E. WEISIGER:

Callicrein inactivators.
Amer. J. Physiol. 142, 941 - 943 (1944).

GJURIS, V., B. HEICKE, E. WESTERMANN:

Über die Stimulierung der Atmung durch Bradykinin und Kallidin.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 247,
429 - 444 (1964).

GLAZER, A.N., A. BAR-ELI, E. KATCHALSKI:

Preparation and characterization of polytyrosyl trypsin.
J. Biol. Chem. 237, 1832 - 1838 (1962).

GRAEFF, F.G., S.H. FERREIRA, A.P. CORRADO, M. ROCHA E SILVA:

Potential of the cerebral vascular action of bradykinin by
the "bradykinins potentiating factor" (BPF) in the dog.
Experientia 21, 607 - 608 (1965).

GRAY, W.R.:

Dansyl chloride procedure.
Methods Enzymol. 11, 139 - 151 (1967).

GREEN, N.M., E. WORK:

Pancreatic trypsin inhibitor. I. Preparation and properties.
Biochem. J. 54, 257 - 266 (1953).

HABEEB, A.F.S.A., H.G. CASSIDY, S.D. SINGER:

Molecular structural effects produced in proteins by reaction
with succinic anhydride.
Biochim. Biophys. Acta 29, 587 - 593 (1958).

HABEEB, A.F.S.A.:

Determination of free amino groups in proteins by trinitro-
benzenesulfonic acid.
Anal. Biochem. 14, 328 - 336 (1966).

HABERMANN, E.:

Zur Reinigung und Wirkungsweise von Kallikrein.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 241,
543 - 544 (1961).

HABERMANN, E.:

Trennung und Reinigung von Pankreaskallikreinen.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 328, 15 - 23 (1962).

HABERMANN, E.:

Unterscheidung von Kallikreinen und Kallikreinvorstufe mittels
Antiseren und Diisopropylfluorophosphat.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 328, 24 - 30 (1962).

HABERMANN, E.:

Fortschritte auf dem Gebiet der Plasmakinine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 245,
230 - 253 (1963).

HABERMANN, E.:

Strukturaufklärung kininliefernder Peptide aus Rinderserum-
Kininogen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 253,
474 - 483 (1966).

HAYNES, R., D.T. OSUGA, R.E. FEENEY:

Modification of amino groups in inhibitors of proteolytic
enzymes.
Biochemistry 6, 541 - 547 (1967).

HEIMBURGER, N.:

Biochemistry of proteinase inhibitors from human plasma:
A review of recent development.
Bayer-Symposium V "Proteinase-Inhibitors", by Springer-Verlag,
14 - 22 (1974).

HESTRIN, S.:

The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid
derivatives with hydroxylamine, and its analytical application.
J. Biol. Chem. 180, 249 - 261 (1949).

HUBER, R., D. KUKLA, A. RÜHLMANN, W. STEIGEMANN, H. J. SCHRAMM:

Pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz). I. Structure and
function. II. complexes with proteinases.
Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. Vol. XXXVI, 141 - 150
(1971).

HUBER, R., D. KUKLA, W. BODE, P. SCHWAGER, K. BARTELS,
J. DEISENHOFER, W. STEIGEMANN:

Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine
pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement
at 1.9 Å resolution.

J. Mol. Biol. 89, 73 - 101 (1974).

JACOBSEN, S., M. KRIZ:

Some data on two purified kininogens from human plasma.
Br. J. Pharmacol. 29, 25 (1967).

KAGEN, L.J.:

Some Biochemical and physical properties of the human permea-
bility globulins. Br. J. exp. Pathol. 45, 604 - 611 (1964).

KASELL, B., M. RADICEVIC, M.J. ANSFIELD, M. LASKOWSKI, Sr.:

The Basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. IV. The linear
sequence of the 58 aminoacids.

Biochem.Biophys. Res. Comm. 18, 255 - 258 (1965).

KRAUT, H., E.K. FREY, E. BAUER:

Über ein neues Kreislaufhormon. II.Mitteilung.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 175, 97 - 114 (1928).

KRAUT, H., E.K. FREY, E. WERLE:

Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse.
(IV. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon).

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 189, 97 - 106 (1930).

KRAUT, H., E.K. FREY, E. WERLE:

Über die Inaktivierung des Kallikreins. VI. Mitteilung über
dieses Kreislaufhormon.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 192, 1 - 21 (1930).

KRAUT, H., W. KÖRBEL, W. SCHOLTAN, F. SCHULTZ:

Versuche zur Isolierung des Kallikrein-Inaktivators. III. Elektrophoretische Reinigung und Molekulargewichtsbestimmung in der Ultrazentrifuge.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 321, 90 - 96 (1960).

KRESS, L.F., M. LASKOWSKI, Sr.:

The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. VII. Reduction with Borohydride of disulfide bond linking half-cystine residues 14 and 38.

J. Biol. Chem. 242, 4925 - 4929 (1967).

KRESS, L.F., K.A. WILSON, M. LASKOWSKI, Sr.:

The basic trypsin inhibitor of bovine pancreas. VIII. Changes in activity following substitution of reduced half-cystine residues 14 and 38 with sulfhydryl reagent.

J. Biol. Chem. 243, 1758 - 1762 (1968).

KRONEBERG, G., K. STOEPEL:

Vergleichende Untersuchungen über die Kreislaufwirkung von Kallikrein (Padutin), Kallidin und Bradykinin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 245, 284 - 285 (1963).

KRONEBERG, G., K. STOEPEL, J. PÜTTER:

Kreislaufuntersuchungen über die Pharmakodynamik des Kallikrein-Kinin-Systems am Hund.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 251, 183 - 184 (1965).

KUNITZ, M.:

Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound.

J. gen. Physiol. 19, 991 - 1007 (1936).

KUTZBACH, C., G. SCHMIDT-KASTNER:

Kallikrein from pig pancreas.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 1099 - 1106 (1972).

LASKOWSKI, M., Jr.:

Mündliche Mitteilung.

LIGHT, A., N.K. SINHA:

Difference in the chemical reactivity of the disulfide bonds of trypsin and chymotrypsin.

J. Biol. Chem. 242, 1358 - 1359 (1967).

LUDÁNY, G., J. VAJDA, I. BERTHA:

Bradykinin and the bacterium-phagocytosis of leucocytes.

Naturwissenschaften 54, 51 (1967).

MARX, R., P. CLEMENTE, E. WERLE, W. APPEL:

Zum Problem eines Antidotes in der internen Thrombotherapie mit Fibrinolytika.

Blut 5, 367 - 375 (1959).

MAXWELL, G.M., R.B. ELLIOTT, G.M. KNEEBONE:

Effects of bradykinin on the systemic and coronary vascular bed of the intact dog.

Circ. Res. 10, 359 - 363 (1962).

MORIYA, H., K. YAMAZAKI, H. FUKUSHIMA:

Biochemical studies on kallikreins and their related substances III. Preliminary experiment of studies on human plasma kallikrein.

J. Biochem. 58, 315 - 319 (1965).

MÜLLER-BERGHaus, G., F.-D. MAUL, H.-G. LASCH:

Prevention of the liquid induced consumption coagulopathy by the protease inhibitor aprotinin.

Thromb. Diath. Haemorrh. 27, 396 - 406.

OATES, J.A., K. MELMON, A. SJOERDSEMA, L. GILLESPIE, D.T. MASON:

Release of a kinin peptide in the carcinoid syndrome.

Lancet 1-1964, 514 - 517 (1964).

OPPITZ, K.-H.:

Verteilung und Ausscheidung von natürlich vorkommenden und chemisch modifizierten Proteaseinhibitoren nach intravenöser Injektion. Vergleichende Untersuchungen.
Diss. Med. Fak. Univ.-München, 1969.

PFEFFER, R.B., O. STASIOR, J.W. HINTON:

The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog.
Surg. Forum 8, 248 (1957).

ROCHA E SILVA, M., W.T. BERALDO, G. ROSENFELD:

Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin.
Amer. J. Physiol. 156, 261 - 273 (1949).

ROCHA E SILVA, M., S.R. ROSENTHAL:

Release of pharmacologically active substances from the rat skin in vivo following thermal injury.
J. Pharmacol. exp. Ther. 132, 110 - 116 (1961).

ROCHA E SILVA, M.:

Definition of bradykinin and other kinins.
Biochem. Pharmacol. 10, 3 - 21 (1962).

ROCHA E SILVA, M.:

The physiological significance of bradykinin.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 190 - 211 (1963).

ROEDER, O.:

Reinigung der Kallikreine aus den Submandibularis-Drüsen und dem Harn vom Schwein mit einigen Untersuchungen zu ihrer Chemie.
Dissertation Med. Fak. Univ.-München, 1968.

SCHNELLS, G.:

Therapie mit Proteinasen-Inaktivatoren.
Monatskurse ärztl. Fortbild. 21, 245 - 247 (1971).

SICUTERI, F., M. FANCIULLACCI, G. FRANCHI, P.L. DEL BIANCO:
Serotonin-bradykinin potentiation on the pain receptors in man.
Life Sci. 4, 309 - 316 (1965).

SIEBERT, G., E. WERLE, G. JUNG, L. MAIER:

Intracelluläre Verteilung von Kallikrein und von Bradykininogen
im Schweinepankreas.
Biochem. Z. 326, 420 - 423 (1955).

TAKAHASHI, K.:

The reaction of the phenylglyoxal with arginine residues
in proteins.
J. Biol.Chem. 243, 6171 - 6179 (1968).

TEWKSBURY, D.A., M.A. STAHMANN:

Potentiation of bradykinin by a liver extract.
Arch. Biochem. Biophys. 112, 453 - 458 (1965).

TRAPNELL, J.E., C.C. RIGBY, C. H. TALBOT, E.H.L. DUNCAN:

A controlled trial of trasyolol in the treatment of acute
pancreatitis.
Br. J. Surg. 61, 177 - 182 (1974).

TRAUTSCHOLD, J., E. WERLE:

Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner
Inaktivatoren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 325, 48 - 59 (1961).

TRAUTSCHOLD, J., E. WERLE, H. HAENDLE, H. SEBENING:

Pathogenese, Diagnostik, Klinik und Therapie des exokrinen
Pankreas. in: H. HENNING, K. HINKEL und H. SCHÖN.
Schattauer-Verlag, Stuttgart 1964, S. 289.

TRAUTSCHOLD, J.:

Habilitationsschrift.
Med. Fak. München, 1965.

TRAUTSCHOLD, J., E. WERLE, G. ZICKGRAF-RÜDEL:

Über den Kallikrein-Trypsin-Inhibitor.
Arzneim.-Forsch. 16, 1507 - 1515 (1966).

WEBSTER, M.E., O.D. RATNOFF:

Role of Hageman factor in the activation of vasodilator
activity in human plasma.
Nature 192, 180 - 181 (1961).

WEBSTER, M.E., I. INNERFIELD:

Interrelationship of human plasma kallikrein and plasmin
in inflammation.
Enzymol. biol. clin. 3, 129 - 148 (1965)

WEBSTER, M.E.:

The kallikrein-kininogen-kinin system.
Arthritis. Rheum. 9, 473 - 482 (1966).

WERLE, E.:

Über Kallikrein aus Blut.
Biochem. Z. 287, 235 - 261 (1936).

WERLE, E., W. GÖTZE, A. KEPPLER:

Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und
über eine neue darmkontrahierende Substanz.
Biochem. Z. 289, 217 - 233 (1937).

WERLE, E., K. FLOSDORF:

Zur Kenntnis der Chemie und Pharmakologie des Kallikreins.
Biochem. Z. 296, 282 - 288 (1938).

WERLE, E., M. GRUNZ:

Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uteruserregenden und blutdrucksenkenden Substanz DK.

Biochem. Z. 301, 429 - 436 (1939).

WERLE, E., L. MAIER, E. RINGELMANN:

Hemmung von Proteinasen durch Kallikrein-Inaktivatoren.
Naturwissenschaften 39, 328 (1952).

WERLE, E., L. MAIER:

Über das Vorkommen von Kallikrein in der Lunge.

Klin. Wochenschr. 33, 1103 - 1104 (1955).

WERLE, E., M.M. FORELL, L. MAIER:

Zur Kenntnis der blutdrucksenkenden Wirkung des Trypsins.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. 225,
369 - 380 (1955).

WERLE, E., W. APPEL:

Photochemische Inaktivierung von Kallikrein durch Methylen-
blau.

Z. Vitam.-Horm.-Ferment.-Forsch. 8, 24 - 28 (1956).

WERLE, E., B. KAUFMANN-BOETSCH:

Über eine esterspaltende Wirkung von Kallikrein.

Naturwissenschaften 46, 559 (1959).

WERLE, E., B. KAUFMANN-BOETSCH:

Über esteratische Wirkungen von Kallikrein und Trypsin und
ihre Hemmung durch Kallikrein- und Trypsininhibitoren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 319, 52 - 63 (1960).

WERLE, E., R. VOGEL:

Über die Freisetzung einer kallikreinartigen Substanz aus
Extrakten verschiedener Organe.

Arch. int. Pharmacodyn. Ther. 131, 257 - 261 (1961).

WERLE, E.:

Zur Biochemie und Physiologie der Proteinasen-Inhibitoren.

- eine Übersicht -

Ärztl. Forsch. 22, 41 - 48 (1968).

ZUBER, M., E. SACHE:

Isolation and characterization of porcine pancreatic kallikrein.

Biochemistry 13, 3098 - 3110 (1974).

Lebenslauf

- 21.10.1925 geboren in Cassenvitz/Rügen.
Eltern: Friedrich Wilhelm Schult und Frau Ida,
geborene Wesch.
- 1932 Volksschule in Cassenvitz/Rügen.
- 1934 Osteomyelitis (Versteifung des linken Kniegelenkes).
- 1937 Oberschule in Putbus auf Rügen.
- 1942 Oberschule für Jungen in Greifswald.
- 1944 Reifevermerk.
- 1944/45 Arbeit im Physiologisch-chemischen Institut der
Universität Greifswald und Studium der Medizin
(Prof. Dr. F.A. Hoppe-Seyler).
- 1947 Reifeprüfung im naturwiss.-math. Zweig der Oberschule
in Bergen-Rügen.
- 1948 TH Dresden: Berufspädagogik.
- 1949 Berufsschullehrer in Ueckermünde/Vorpommern.
- 1952 Berufsschullehrer in Leipzig.
- 1955 Praefekt in Regensburg: Protestantisches Alumneum.
- 1957 Studium der Naturwissenschaften in München.
- 1958 Studium der Chemie in München.
- 1960 Herausgabe einer Broschüre über Anorganische Papier- und Anorganische Ionenaustauschchromatographie.
- 1961 Diplomchemikervorprüfung.
- 1962 Mitgliedschaft in der "Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte."

- 1965 Diplomchemikerhauptprüfung.
- 1965-66 Anfertigung der Diplomarbeit im "Institut für klin. Chemie und klinische Biochemie" an der Chirurgischen Klinik in München (Prof. Dr. Dr. E. Werle). Anschließend Beginn mit der Anfertigung der Doktorarbeit.
- 1966-67 Vorlesungen in Physiologie und Physiologischer Chemie in München.
- 1967/68 Physiologisches Praktikum (Prof. Dr. K. Kramer).
- 1971 Wissenschaftlicher Angestellter in der "Abteilung für Experimentelle Chirurgie und Pathologische Biochemie" an der Chirurgischen Universitätsklinik in Marburg (Prof. Dr. W. Lorenz).
- 1972 Lehrbeauftragter im Fachbereich 20 der Philipps-Universität Marburg/Lahn.
- 1974 Forum des Deutschen Chirurgenkongresses in München: "Probleme bei der Bestimmung der proteolytischen Aktivität des menschlichen Magensaftes" (Vortrag).
- 1974 Studium der Humanbiologie.
- 1977 Treffen des Europäischen Histaminklubs in London: "Anstieg der Plasma-Histamin-Spiegel bei der experimentellen Pankreatitis des Hundes nach Pfeffer." (Vortrag).

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten:

in Greifswald: HOPPE-SEYLER, JANDER, LOESCHCKE, PFUHL, REIN-
KOBEL, SEELIGER, SCHMIDT.

in Dresden: DÄHNE, KÖHLER, MÜLLER, PRENZEL, REISSIG, SCHU-
BERT.

in München: AMBERGER, BEHRINGER, BÜCHER, BUTENANDT, DANE,
DICKEL, FAESSLER, E.O. FISCHER, GRASSMANN,
HAFNER, HUISGEN, JAENICKE, KLAGES, KLEMENT,
KRAMER, LUX, LYNEN, NÖTH, PETTE, SAUER,
E. SCHMIDT, M. SCHMIDT, SCHWAB, STETTER, TURBA,
WIBERG, WILLE.

in Marburg: AMMON, DILG, HENSEL, JÜTTNER, KARLSON, KOOL-
MAN, SCHMITZ, VON KRAFT.

